RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

Vol. IV, fasc. 8, 9 e 12, 1° Semestre 1888.

STUDI SUL SANGUE

COMUNICAZIONI

DEL SOCIO

ANGELO MOSSO

(Dalla Nota IX alla XIV)

555

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1888

Fisiologia. — *Applicazioni del verde metile per conoscere la reazione chimica e la morte delle cellule.* Nota IX. del Socio A. Mosso.

« Fu Heidenhain che ebbe il primo l'idea di servirsi delle sostanze coloranti per studiare le funzioni delle cellule (1) e sono note le sue celebri esperienze col solfo indigotato di soda. Certes (2) trovò che i corpuscoli bianchi del sangue della rana lasciati per 24 ore in una camera umida si coloriscono leggermente colla cyanina, quantunque presentino ancora dei movimenti ameboidi. Brandt (3) si servì dell'ematossilina per studiare gli infusori; ed avendo osservato che nei vacuoli delle amebe il colore violetto dell'ematossilina cambia in bruno, conchiuse che i vacuoli sono un organo di escrezione, e che contengono una sostanza acida.

« Pfeffer pubblicò recentemente un lavoro assai pregevole intorno all'*assorbimento dei colori di anilina nelle cellule viventi* (4). Sono ricerche fatte sulle piante, che hanno un grande interesse per la biologia cellulare. Pfeffer vide che il protoplasma finchè è vivo non si lascia colorire dal bleu di metilene, mentre che invece si tinge colla più grande facilità appena si altera e muore. La colorazione delle cellule vive succede più facilmente, col violetto metile, ma Pfeffer fa notare che il violetto metile è una sostanza molto velenosa e che bisogna essere cauti nel conchiudere. La colorazione del nucleo che succede dopo pochi minuti, quando si fa agire una soluzione del 0,0003 per cento o anche solo del 0,0001 per cento, sarebbe già dovuta, secondo Pfeffer, ad un'alterazione delle cellule.

« In nessun caso col violetto metile egli trovò una colorazione del protoplasma, o del nucleo, durante la vita; e i punti che nelle piante si lasciano colorare meno facilmente, sono quelli dove sono più numerose le cellule giovani.

« Ehrlich fece alcuni lavori assai interessanti in questo riguardo. Nel suo scritto intorno alla reazione della sostanza nervosa vivente col bleu di metilene (5) egli fa notare che la reazione alcalina e la saturazione coll'ossigeno sono due condizioni indispensabili perchè succeda la colorazione azzurra dei nervi.

« La reazione chimica delle cellule si può conoscere con varii colori di anilina: quello che mi diede i migliori risultati è il verde metile (6).

---

(1) R. Heidenhain, Pflüger's Archiv 1874, Bd. 9, p. 1.

(2) A. Certes, Comptes rendus 1881, vol. 92, p. 424.

(3) K. Brandt, Biolog. Centralblatt, 1881, p. 202.

(4) W. Pfeffer, Untersuchungen aus dem botan. Institut in Tübingen, Bd. II, p. 179.

(5) Ehrlich, Deutsch. med. Wochenschrift 1886, N. 4.

(6) Il verde metile che adoperai in queste ricerche mi era stato provveduto dal signor Trommsdorff di Erlangen e dal signor Grübler di Lipsia.

« Il verde metile ($C_{25} H_{31} Cl_4 N_3 Zn$) fu introdotto nella tecnica microscopica da E. Calberla (1). Egli vide che i nuclei delle cellule del tessuto connettivo sottocutaneo, dei vasi, e del neurilemma si coloriscono in rosa: che le cellule del corion, e specialmente il loro nucleo, si colorisce in rosso violetto: che gli elementi dell'epidermide prendono un colore verde azzurro. Calberla non cercò le cause di questa differenza di colore. Erlicki estese l'uso del verde metile alle indagini istologiche dei centri nervosi.

« Ehrlich (2) si servì del verde metile nello studio dei leucociti, ma in combinazione colla fucsina acida, il che non gli ha permesso di avere conoscenza delle reazioni specifiche di questa sostanza. In seguito ad uno studio fatto con molti colori di anilina, egli affermò che nei leucociti vi sono cinque qualità differenti di granulazioni specifiche che si coloriscono con differenti colori. Ehrlich metteva una piccola goccia di sangue fra due vetrini: dopo averlo disteso con leggiera pressione in uno strato sottile, staccava i vetrini, e li faceva essicare alla temperatura di 120° a 130° per 2 o 3 ore, quindi li coloriva con varie sostanze. Egli dice che le differenti granulazioni specifiche si producono come una attività secretoria delle cellule, ma non dà alcun sviluppo a questa dottrina, che si limita ad accennare dopo aver detto che sulla natura di queste granulazioni mancano dei dati positivi.

« Heschel (3) adoperò il verde metile come reagente per conoscere la sostanza amiloide, e dopo lui Curschmann (4) confermò che i tessuti in degenerazione amiloidea si coloriscono in violetto e che le parti non degenerate si coloriscono in azzurro od in verde.

« Strassburger (5) se ne servì per colorire le figure cariocinetiche e dopo lui parecchi altri lo adoperarono col medesimo scopo, ma nessuno che io sappia cercò di conoscere la causa delle differenze di colore che presentano le cellule immerse in una medesima soluzione di questa sostanza.

« Generalmente mi servo del verde metile in una soluzione acquosa di cloruro sodico all' 1 per cento, nella quale è sciolto il 0,2 per cento di verde metile. Quanto alla dose di cloruro sodico, bisogna che il titolo della soluzione corrisponda alla resistenza delle cellule che si devono studiare, perchè una soluzione troppo acquosa le altera subito. Per vedere l'azione del verde metile sui leucociti e sui corpuscoli rossi del nostro sangue basta fare una puntura in un dito, e messa una goccia della soluzione su di un vetro porta oggetti toccare con essa leggermente la goccia di sangue.

(1) E. Calberla, Morphologisches Jahrbuch, III. 1877, p. 625.

(2) P. Ehrlich, Zeitschrift für klinische Medicin, I, 1880, p. 553.

(3) Heschel, Wiener med. Wochenschrift, 1879, N. 2.

(4) Curschmann, Arch. f. path. Anat. und Phys. Bd. LXXIX, p. 556.

(5) Strassburger, Arch. f. Mikrosk. Anatomie, Bd. XXI, p. 476. *Zellbildung und Zelltheilung*, 3. Aufl. p. 141.

« Nel primo momento i leucociti sembrano resistere, dopo prendono una tinta uniforme leggermente violetta che va sempre più rinforzandosi (1).

« I corpuscoli rossi si alterano, alcuni si infossano e prendono la forma di una coppa: in altri appaiono nel centro delle infossature irregolari, e questo assottigliarsi della sostanza gialla del corpuscolo nel mezzo, produce delle figure simili a quelli che Marchiafava e Celli hanno descritto come caratteristiche dell'infezione malarica (2).

« Per seguire le trasformazioni che subiscono gli elementi del sangue nel verde metile basta mettere il preparato nella camera umida, oppure (se si chiude la goccia di sangue in un cerchio di vasellina come indicai nella Nota III (3) si può lasciare il preparato sotto il microscopio e seguire per molte ore le trasformazioni che subisce il sangue.

« Dopo 6 ore alcuni leucociti prendono una tinta più azzurrognola, ed altri diventano verdi, ma il maggior numero ha un colore violetto intenso. Le figure plasmodiche nei corpuscoli rossi sono quasi scomparse, molti corpuscoli hanno perduto il loro color giallo e sono divenuti trasparenti.

« Dopo 24 ore molti leucociti hanno i cosidetti nuclei intensamente coloriti in verde; la rimanente parte del corpuscolo è fatta da una sostanza granulosa leggermente azzurrognola; alcuni leucociti si sono disfatti, e lasciarono un detrito granuloso di colore violaceo.

« I leucociti rimasti violetti continuano ad avere i nuclei poco distinti in confronto di quelli colorati in verde. Vi sono dei leucociti violetti coi nuclei verdi, sui quali cominciano ad apparire delle sporgenze e delle goccie ialine.

« Sotto l'influenza del verde metile alcuni corpuscoli rossi perdono nelle prime ore l'emoglobina, si scoloriscono e formano le così dette ombre; più tardi appare un'altra differenza fra i corpuscoli rossi più resistenti. Alcuni diventarono fortemente granulosi e si colorirono in azzurro violetto senza che la loro forma siasi alterata. Altri si coloriscono in azzurro violaceo senza diventare granulosi: in altri la parte centrale rimane omogenea, si colorisce in azzurro verdognolo, e intorno si forma uno strato finamente granuloso.

« Il verde metile produce altre modificazioni dei corpuscoli rossi, che sono interessanti per conoscere la struttura di queste cellule. Questo argomento lo tratterò in un'altra Nota.

---

(1) Le osservazioni contenute in questa Nota e nelle seguenti, vennero fatte con un obbiettivo apocromatico Zeiss 2,0 millimetri ad immersione omogenea, apertura 1,30. Mi servii quasi sempre dell'oculare N. 4: per un maggiore ingrandimento del N. 12, ed in casi eccezionali, del N. 18.

(2) Ritornerò in una delle seguenti Note su questo argomento per confermare con nuove osservazioni il dubbio già espresso, che le figure plasmodiche siano probabilmente delle infossature centrali dovute alle alterazioni di necrobiosi dei corpuscoli rossi.

(3) Rendiconti dell'Accademia dei Lincei, 1887. Vol. III, 1° Sem. pag. 318.

« Il pus fresco trattato col verde metile serve meglio del sangue per dimostrare le grande differenza di colorazione dei leucociti. Riferisco un osservazione in esteso per dare un'idea più concreta del modo di agire di questa sostanza.

« 15 GENNAIO 1888. Incido con una lancetta una piccola pustola che mi è venuta sopra una mano, e dopo aver messo una goccia della soluzione (verde metile 0,2 per cento, Na Cl 1 per cento) sul vetro portaoggetti, tocco colla pustula questa goccia in modo che vi passi dentro del pus. Pel maggior numero i corpuscoli del pus appaiono come sfere bianche in un liquido verde: molti corpuscoli sono coloriti in violetto: pochi sono già verdi.

« I corpuscoli verdi non presentano più alcuna traccia di movimento. Quelli che si muovono sono incolori ed alcuni hanno una tinta leggermente violetta.

« I corpuscoli rossi sono poco numerosi: alcuni sono rotondi e normali; altri sono incavati come una coppa, altri hanno delle infossature centrali irregolari per cui ne risulta nel mezzo una figura chiara che rassomiglia ai plasmodi di Marchiafava e Celli.

« I corpuscoli rossi resistono bene, ma in alcuni vedesi che si formò da un lato una mezza luna granulosa, la quale si è colorita in violetto, mentre che la massa del corpuscolo è per due terzi costituita da un corpuscolo giallo omogeneo.

« La sostanza ialina dei corpuscoli del pus che forma delle goccie, e dei gavoccioli attaccati alla superficie non si colorisce, e dentro ai corpuscoli vi sono dei frammenti verdi o violetti come ho già descritto nella Nota V e VII.

« Dopo dieci minuti quasi tutti i corpuscoli bianchi sono scomparsi, e sono diventati più numerosi i corpuscoli violetti e verdi.

« Metto il preparato nella camera umida e lo riprendo dopo due ore. I corpuscoli gialli hanno resistito bene, il maggior numero conserva il colore normale, solo alcuni pochi sono coloriti in verde ed hanno un grosso nucleo più intensamente colorato che misura 5 μ di diametro, e intorno vi è una sostanza granulosa tinta in verde chiaro per cui il diametro del corpuscolo è di 7 μ. Altre forme analoghe mostrano il passaggio dei corpuscoli rossi con gradi meno intensi di colorazione dove predomina ancora la tinta gialla.

« Nei corpuscoli del pus vi è una sostanza finamente granulosa che si colorisce difficilmente, ed un'altra che si colorisce più facilmente. Questa seconda sostanza forma dei globetti più o meno regolari che ho chiamato frammenti, perchè non sono veri nuclei. Questi globetti o frammenti prima appaiono bianchi, poi violetti, poi azzurrognoli, ed in ultimo verde smeraldo. Essi sono un prodotto del processo di necrobiosi, e derivano da una specie di coagulazione, da un disgiungersi, o dal rigonfiarsi delle sostanze che costituiscono il corpuscolo. Una terza sostanza che vediamo nei corpuscoli del pus è la così detta sostanza ialina che non si colorisce mai. Dopo 24 ore, invece dei violetti, predominano i corpuscoli colorati in verde. Se ne vede ancora qualcheduno bianco. Rimetto il preparato nella camera umida e lo esamino dopo tre giorni. Tutti i corpuscoli del pus sono verdi e bene conservati. Sono rari quelli che hanno una tinta violacea, e anche in essi la tendenza è al verde più che all'azzurro. In alcuni vi sono due o tre frammenti globosi di color verde, e accanto uno o due globetti simili di color violetto. In tutte queste cellule la parte meno colorata è quella granulosa che forma il corpo della cellula, dentro alla quale stanno i così detti nuclei, o frammenti corpuscolari.

« Le granulazioni delle cellule sono splendenti, e la massa ialina incolora è più sviluppata che nel primo giorno, per cui molte cellule non sono più rotonde, ma elissoidee con delle sporgenze ialine trasparenti da un lato. Dopo quattro giorni non vi è più un solo corpuscolo del pus che abbia la tinta violetta, sono tutti verdi smeraldo. Pochissimi sono incolori, e questi hanno aspetto di una massa ialina trasparente poco granulosa senza

nuclei o frammenti. Alcuni corpuscoli del pus sono fortemente granulosi, e formano come una sfera che contiene dentro due o tre globetti di color verde smeraldo.

« I corpuscoli del pus sono costituiti da una sostanza finamente granulosa che forma come una spugna che non si colorisce, e dentro a questa sfera vi sono dei globetti di una sostanza che si è colorita intensamente in verde. Nel primo periodo, quando tutta la cellula era colorita in violetto, tale distinzione fra le due sostanze era meno evidente.

« Abbiamo già veduto nelle note precedenti che il pus giovine si distingue dal pus vecchio per una differenza profonda nella struttura dei corpuscoli, che rappresentano dei gradi diversi e più o meno progrediti nella degenerazione. Questa distinzione viene ora confermata dalla reazione col verde metile, per mezzo della quale i corpuscoli giovani si coloriscono in violetto, mentre si coloriscono in verde quelli che si trovano nell'ultima fase del processo di necrobiosi. Nel pus giovane e fresco vediamo che il maggior numero dei corpuscoli diventa violetto e pochi sono coloriti in verde. Se conserviamo il medesimo pus in un vetro da orologio per 4 o 5 giorni nella camera umida, e dopo lo esaminiamo, si trova che quasi tutte le cellule si coloriscono immediatamente in verde smeraldo. Se affrettiamo la decomposizione del pus mettendolo in una stufa alla temperatura di 38°, le cellule perdono la proprietà di colorirsi in violetto, ed appaiono subito verdi. La stessa cosa si verifica se prendiamo, da un ascesso del pus vecchio di parecchie settimane.

« Vedendo che una medesima cellula si colorisce prima in violetto, poi in azzurro e finalmente in verde, bisogna supporre che la colorazione dipenda da un fatto chimico, il quale si modifichi col processo di necrobiosi.

» Le cellule che si trovano in condizioni normali di vitalità non si lasciano colorire intensamente; anche quando sono già entrate nella prima fase del processo di necrobiosi, resistono ancora alla imbibizione delle sostanze coloranti. Mi sono assicurato di questo fatto non solo col verde metile, ma adoperando il rosso di Magdala, o l'eosina, o il violetto metile, o il verde di jodo, o l'azzurro di metilene ecc. Di queste osservazioni ne riferisco una sola fatta sopra il pus preso da un piccolo ascesso formatosi sotto la lingua.

Rosso di Magdala 0,4 per cento. NaCS *0,75 per cento.*

« Metà circa dei corpuscoli del pus si coloriscono subito in rosso, l'altra metà non si lascia tingere. Guardando più attentamente si vede che nei corpuscoli di pus i quali non si lasciano colorire, vi è un movimento vivace dei granuli; mentre che nei corpuscoli di pus colorati in rosso tutto è immobile. Fissando lungamente una cellula coi granuli in movimento, si vede che questa poco per volta si colorisce e anche i granuli si arrestano. In questo pus i corpuscoli rossi sono molto scarsi.

« Riepilogando risulta dalle esperienze sovraesposte che le cellule non si lasciano colorire, quando danno segno di essere nel pieno esercizio delle loro funzioni vitali; che venendo queste a diminuire, si coloriscono in violetto; che tale tinta si modifica successivamente nella medesima cellula, prima tende al verde azzurro, e finisce per diventare verde chiaro smeraldo.

« Questo è quanto si osserva generalmente nelle cellule, ma ve ne sono di quelle che sembrano diventare verdi senza essere state prima violette.

« Colla soluzione del verde metile 0,2 per cento, Na Cl. 1 per cento, si osserva una rapida e profonda alterazione dei leucociti.

« Nel sangue dei pesci (*Mustelus laevis*, p. e.) dopo aver fissato l'attenzione sui corpuscoli bianchi omogenei che eseguiscono dei rapidi movimenti, se si aggiunge una goccia della soluzione sul bordo del vetrino, i leucociti ritirano immediatamente le loro espansioni, diventano globosi e dentro appaiono molti globetti o vacuoli. Il corpuscolo prende una tinta leggermente violetta. I vacuoli non si coloriscono, invece il nucleo è più intensamente colorato in violetto, ed è rotondo, o ha la forma di un rene, o sono due nuclei vicini.

« Alcuni corpuscoli in pochi minuti diventano una sfera ialina con delle granulazioni grosse e dei frammenti in forma di nucleo da una parte, e dall'altra si vede la sostanza ialina che ha dentro dei granuli che si muovono vivacemente come ho già descritto nei corpuscoli del pus. Altre volte il corpuscolo bianco che si muove, sorpreso dall'azione deleteria di questa soluzione, si altera prima che abbia tempo di conglobarsi e appaiono dentro al corpuscolo ancora disteso ed irregolare, dei vacuoli o dei globettini in numero di 10, o 15,0 anche più, intorno al nucleo: e poco dopo il corpuscolo appare violetto, ritira le espansioni e diventa sferico.

« Il verde metile al 0,2 per cento nella soluzione di cloruro sodico all'uno per cento, produce in questo caso una morte così rapida dei leucociti, che noi vediamo succedersi in un medesimo corpuscolo le trasformazioni che nel pus dentro all'organismo dei mammiferi impiegano un tempo assai maggiore. Vediamo cioè dei leucociti, prima omogenei, che si arrestano raccolgono le loro espansioni e diventano globosi; dentro (forse per un processo di coagulazione) si forma un certo numero di globetti da 15 a 20 o 30 che riempiono tutta la cellula; alcuni frammenti maggiori si coloriscono più intensamente e rappresentano i nuclei; e nell'ultimo periodo della necrobiosi, si separa dalle granulazioni una sostanza ialina nella quale si vedono dei granuli che si muovono come quelli del pus, mentre il resto della cellula è intensamente colorato.

« Le cellule epiteliali con ciglia vibratili e gli spermatozoi sono gli elementi più indicati per studiare i rapporti che passano fra la colorazione delle cellule e la loro vitalità. Se si prende un pezzo della muccosa della faringe di una rana e lo si dilacera nella soluzione (0,2 per cento Na Cl 0,75 per cento) le cellule nelle quali le ciglia si muovono hanno un colore violetto, quelle dove le ciglia sono immobili hanno invece un color verde. Fissando l'attenzione su queste che hanno le ciglia mobili, si vede che non presentano traccia di nucleo: dopo mezz'ora circa, si fermano le ciglia ed appaiono uno o due nuclei di colore azzurro, ma il loro contorno è confuso; solo dopo 2 o 3 ore circa il nucleo è più distinto e prende una tinta verde:

le ciglia non sono colorate. Dopo 4 o 5 ore tutti i nuclei sono coloriti in verde smeraldo e sono rare le cellule che hanno una tinta violacea.

« Ho ripetuto le medesime osservazioni sulle cellule a ciglia vibratili dell' *Unio* e dell'*Anodonta*, che ricoprono le branchie, o che stanno sul mantello. Queste ultime servono meglio perchè si staccano spontaneamente, e siccome hanno le ciglia molto lunghe, si vede ogni più piccola traccia di movimento, e il volume considerevole del loro corpo rende più facile lo studio delle alterazioni necrobiotiche.

« Le cellule dell'*Anodonta* e dell'*Unio* finchè si muovono con vivacità non si lasciano colorire dal verde metile, nè dal rosso Magdala, nè da altre sostanze. Questo è il periodo della piena vitalità, nel quale le cellule eseguiscono dei movimenti così vivaci, che spesso si vedono attraversare il campo del microscopio flagellando colle lunghe ciglia tutti i corpuscoli e le cellule che stanno vicino nel liquido.

« Poi viene il periodo dell'agonia nel quale, o non si muovono più, o si muovono, ma assai lentamente; in questo periodo, o sono incolori, o prendono una leggera tinta violacea, ma non si vede ancora il nucleo.

« Quando si colorisce il nucleo ed appare distinto nel corpo della cellula, le ciglia si sono già fermate, oppure i moti sono molto lenti e interrotti da pause, oppure sono disordinati, cosicchè il ciuffo delle ciglia si divide come in due parti che si muovono in direzione contraria.

« Nelle cellule vibratili che si colorirono in violetto, il nucleo diventa sempre più evidente, può apparire come diviso in parecchi nuclei o frammenti, e questi tendono sempre più all'azzurro e finalmente diventano verdi.

« Il processo di necrobiosi qualche volta è già iniziato e le ciglia si muovono ancora. Questa parte che riguarda la morte e la degenerazione delle cellule con ciglia vibratili la tratterò in una Nota speciale, ed in essa dimostrerò che il processo di necrobiosi studiato nei corpuscoli del sangue si riproduce fedelmente in tutte le sue particolarità nelle cellule epitelliali, e nelle cellule con ciglia vibratili.

« Il verde metile è velenoso anche per gli spermatozoi: ho provato su quelli della cavia, e su quelli della torpedine, e vidi che si fermano subito. Per timore che la soluzione 0,2 per cento e, Na Cl. 1 per cento, non contenesse abbastanza cloruro sodico ho preso la stessa acqua marina come liquido per la soluzione con 0,2 per cento di verde metile e ho veduto che si coloriscono rapidamente e muoiono. Sono rari quelli che essendosi già coloriti fanno ancora dei movimenti, in questo caso si vede che sono moribondi, perchè le loro oscillazioni sono lente non guizzano più, ma si agitano con intervalli di riposo e poi si fermano. Atteso la piccolezza della testa degli spermatozoi non ho potuto constatare con sicurezza se tutti prendono un colore violetto prima di diventare verdi.

« L'azione del verde metile e di altre sostanze coloranti sul protoplasma

contrattile dalle cellule vegetali, l' ho studiato sui peli dei fiori della *Tradescantia virginica* e sulle spore di un alga marina, l'*Ulva lactuca*. L'effetto del verde metile è micidiale. Gli sporangi dell'*Ulva lactuca* sono masse ovali che misurano 3 μ, 5 per 5 μ, le quali portano ad una estremità due appendici filiformi che sono dotate di un movimento vivacissimo. Se all'acqua di mare nella quale stanno queste spore, si aggiunge un po'di verde metile 0,2 per cento sciolto nell'acqua di mare, le spore si coloriscono e si fermano immediatamente. Il contenuto degli sporangi diventa granuloso, ed alla superficie appaiono delle goccie ialine. Il processo della morte rassomiglia a quello dei leucociti, perchè nella sostanza ialina delle spore si vedono dei granuli che si muovono come quelli che ho già descritto nei corpuscoli del pus. Ritornerò in una prossima Nota su questo argomento studiando i fenomeni della necrobiosi nelle cellule vegetali.

« Ho voluto cercare la ragione chimica di questi fatti; e ho trovato che se l'alcalinità delle cellule è molto grande, questa distrugge il verde metile che tende a penetrare nel loro corpo; e perciò la colorazione delle cellule in violetto, sarebbe indizio di un alcalinità meno grande.

« Se si prendono gr. 0,002 di potassa caustica sciolti in 2 cc. di acqua, e vi si aggiungono gr. 0,002 di verde metile in 1 cc. di acqua, il colore verde si modifica e in 5 minuti diventa rosso violaceo, come il colore delle cellule. Se a questa soluzione di colore rosso violaceo si aggiunge qualche goccia di una soluzione di acido acetico 11 per cento, ritorna lentamente il color verde primitivo.

« Se invece di parti uguali adoperiamo un eccesso di verde metile, non succede più la trasformazione del colore in violetto; cioè se a grammi 0,002 di potassa aggiungesi 2 cc. di acqua al gr. 0,003 di verde metile in 3 di acqua, la soluzione rimane verde. In altre parole, questa reazione manca quando adoperiamo una quantità troppo grande di verde metile. In soluzioni più allungate se la quantità dell'alcali non si trova in proporzioni eguali a quella del verde metile, ma è superiore, la soluzione si scolorisce completamente in pochi minuti. Così ad esempio gr. 0,0004 di potassa caustica sciolti in 4 cc. di acqua scoloriscono 0,00016 di verde metile sciolti in 0,08 cc. di acqua. Il verde metile però non si distrugge, perchè se aggiungiamo alla soluzione divenuta trasparente due goccie di una soluzione di acido acetico al 10 per cento, ricompare lentamente il colore verde primitivo.

« Non si può dire però che mescolando un eccesso di potassa nella soluzione di verde metile questo si scolori completamente. Manca il colore perchè le soluzioni sono troppo allungate, ma se invece prendiamo gr. 0,008 di potassa caustica sciolti in 0,8 di acqua e vi aggiungiamo 0,002 di verde metile sciolti in 1 cc. di acqua, quantunque la proporzione della potassa al verde metile sia sempre di 4 ad 1, lo scoloramento non è completo, ed il liquido essendo meno diluito coll'acqua, prende un colore giallo bruno.

« Ho trovato che il verde metile impedisce la coagulazione del sangue.

« Una soluzione del verde metile al 0,5 per cento nel cloruro sodico 0,75 per cento, ritarda notelmente la coagulazione del sangue, anche solo nel rapporto di 2 cc. su 40 cc. di sangue.

« Adoperando 3 o 4 cent. cubici di detta soluzione su 40 cc. di sangue, questo non coagula più. Di questo parlerò più estesamente in una prossima Nota sulla coagulazione del sangue e sulla formazione della cotenna.

« I leucociti del sangue reso incoagolabile col verde metile, hanno la sostanza incolora e dentro i così detti nuclei colorati in verde smeraldo. In alcuni la sostanza verde è circonfusa e riempie tutto il corpuscolo; altri leucociti invece sono completamente scolorati; ma il maggior numerò dei corpuscoli è violetto, senza traccia dei cosidetti nuclei.

« Mescolando 5 o 6 cc. di soluzione di verde metile al 0,5 per cento con 40 cc. di sangue che esce dall'arteria, è facile essicurarsi che il verde metile si distrugge. Già l'esame fatto col microscopio dimostra che l'intensità di colorazione dei corpuscoli e del siero non corrisponde alla quantità di verde metile aggiunto al sangue e molti leucociti rimangono bianchi.

« Aggiungendo al sangue dell'acido acetico in qualunque proporzione ed allungando con acqua, non si ottiene più il color verde caratteristico; questo prova che la scomparsa del verde non è dovuta all'alcalinità del sangue.

« Ho supposto che il verde metile in contatto col sangue si scolorisca per un processo di ossidazione, e cercai se coll'acqua ossigenata potevo riprodurre tale fenomeno. I risultati ottenuti confermarono pienamente questa supposizione; tralascio per brevità di riferire queste esperienze, intorno alle quali dovrò ritornare in una prossima Nota dove parlerò dell'azione fisiologica del violetto di metile ».

Fisiologia. — *Esame critico dei metodi adoperati per studiare i corpuscoli del sangue.* Nota X. del Socio A. Mosso.

« In una Nota precedente sulla resistenza dei corpuscoli rossi (1) ho già dimostrato che una soluzione di cloruro sodico al 0,75 per cento può alterare e scolorire rapidamente i corpuscoli rossi del cane. Nelle seguenti ricerche intorno al sangue dei pesci ho studiato quali siano le soluzioni di cloruro sodico che alterano meno i corpuscoli del sangue: e ho veduto che nel sangue di un medesimo animale vi sono dei corpuscoli rossi di maggiore o minor resistenza, i quali per non alterarsi avrebbero bisogno ciascuno di soluzioni diverse.

« Vi sono dei generi di pesci i quali hanno un sangue tanto delicato, che appena esce dai vasi sanguigni si altera subito in tutte le soluzioni di cloruro sodico, qualunque sia il loro titolo.

« Nè per lo studio del sangue di tali pesci giova procurarsi prima il siero di animali della medesima specie e mescolarlo col sangue che esce dai vasi sanguigni per impedire, od almeno smorzare, il contatto dei corpuscoli

(1) Atti R. Accademia Lincei. Vol. III, pag. 257.

col vetro, perchè l'adesione e l'attrito che si produce, quando i corpuscoli scorrono fra il vetrino ed il porta oggetti, è già sufficiente per scolorire molti corpuscoli.

« L'uso del siero, che sembra essere il metodo più razionale, presenta la grave difficoltà che quando si tratta di specie molto piccole è impossibile di procurarsi del siero puro e trasparente, senza che contenga dei corpuscoli i quali hanno già subìto un'alterazione per essersi trovati fuori dell'organismo. Anche il siero iodato non serve, perchè constatai che esso scolorisce rapidamente tanto i corpuscoli più fragili dei pesci, quanto quelli dei mammiferi.

« Visto che non si può esaminare il sangue vivo e fresco fuori dei vasi sanguigni, mi servii dei liquidi fissatori per rendere solido il sangue nel momento stesso che esce dal corpo. La difficoltà più grave è di trovare un liquido che indurisca i corpuscoli e non ne alteri il colore.

Bicloruro di mercurio

« Goadby è stato il primo che si servì del sublimato corrosivo nella tecnica istologica (1). Fu colle soluzioni di questa sostanza alla quale aggiungeva del cloruro di sodio e dell'allume, che cinquant'anni fa egli è riuscito a conservare i primi preparati microscopici di tessuti animali chiusi fra due vetri.

« Però è stato Filippo Pacini che introdusse definitivamente l'uso del bicloruro di mercurio nella tecnica per la conservazione dei corpuscoli del sangue (2). G. Hayem modificò le formole del Pacini, diminuendo alquanto

(1) Harting, *Das Mikroskop*, 1859, pag. 920.

(2) F. Pacini, *Di alcuni metodi di preparazione e conservazione degli elementi microscopici dei tessuti animali e vegetali.* Giornale internazionale delle scienze mediche, 1880.

La prima pubblicazione delle formole dei liquidi di Pacini fu fatta dal dott. Galligo nel 1861, in una relazione sui preparati che il Pacini presentò all'esposizione nazionale di Firenze (*Imparziale*, I, 1861, pag. 98). In questa comunicazione non si parla dell'aggiunta di glicerina alla soluzione di bicloruro di mercurio. Nel 1880 quando Pacini pubblicò le formole dei suoi liquidi conservatori le ridusse a quattro. Le più importanti per lo studio del sangue sono la 2ª e la 3ª cioè:

II.

Bicloruro di mercurio	1	gr.
Cloruro sodico	2	»
Acqua distillata	200	»

III.

Bicloruro di mercurio	1	gr.
Cloruro sodico	4	»
Acqua distillata	200	»

La soluzione II, che contiene meno cloruro sodico, Pacini la preferisce per conservare i corpuscoli degli animali a sangue freddo; la III, per gli animali a sangue caldo.

la dose del bicloruro di mercurio (1). — Perchè Hayem abbia aggiunto il solfato di soda nella proporzione di 5 grammi per 200 di acqua io non lo so, ed egli stesso non lo dice. Le osservazioni che ho fatto in proposito mi hanno convinto che il solfato di soda è poco adatto per conservare il sangue. Infatti in una soluzione del 2,5 per cento di acqua i corpuscoli rossi perdono la forma discoide diventano sferici e poi si scoloriscono. Se il sangue è poco resistente, è maggiore il numero dei corpuscoli rossi che si scolorano: molti si svotano e troviamo nel liquido dei mucchi di granulazioni gialle e delle ombre.

« L'azione del bicloruro di mercurio sui corpi albuminosi è tanto energica che l'aggiunta del solfato di soda, o della glicerina, credo giovi a nulla.

« Per escludere ogni apprezzamento personale nel giudizio di formole empiriche, ho voluto cercare la ragione delle dosi che l'esperienza aveva dimostrato più efficaci a conservare il sangue. Credo non sia inutile che io riferisca alcune esperienze sull'azione del bicloruro di mercurio, perchè sono giunto alla conclusione che non bisogna più servirsi di questa sostanza nelle ricerche esatte sulla natura dei corpuscoli del sangue.

« Per provare l'azione fissatrice delle varie soluzioni di bicloruro di mercurio mi servii di una stufa d'Arsonval che dava una temperatura costante di 38°. Vi mettevo dentro le boccette che contenevano una goccia di sangue su 30 cc. di uno dei liquidi fissatori, e dopo 12 o 24 ore facevo il confronto tra questo sangue e quello che avevo lasciato in un liquido eguale alla temperatura ambiente di 12° o 16°.

« Col liquido Pacini tanto nella formola II che nella formola III non

---

Deve essere stato verso il 1860, quando era in voga la glicerina come liquido conservatore, che qualcheduno pensò di aggiungere questa sostanza al bicloruro di mercurio, ma non ho potuto sapere chi sia stato il primo che modificò la formola del liquido Pacini, e gliela attribuì erroneamente quale ora si trova nel maggior numero dei trattati di tecnica istologica. H. Reinhard (*Das Mikroskop*, 1864, pag. 26) attribuisce questa formola al Lambl, ma la cosa non mi pare certa.

(1) *Liquido di Hayem* A.

Acqua distillata	200
Cloruro di sodio	1
Solfato di soda	5
Bicloruro di mercurio	0.50

Liquido di Hayem B.

Acqua distillata	200
Cloruro di sodio	1
Solfato di soda	5
Bicloruro di mercurio	0.50
Glicerina neutra a 28° B	10

G. Hayem, *Archives de physiologie*, 1878, p. 70; 1879, p. 208.

si osservò alcuna differenza per il fatto della temperatura elevata. Col liquido Hayem il sangue generalmente resiste alla temperatura ambiente, ma si altera a 38°. Ho trovato dei cani di cui il sangue si alterava nel liquido Hayem anche alla temperatura ambiente. Riferisco una di queste osservazioni:

« Dalla carotide di un cane faccio cadere una goccia di sangue in due boccette che contengono 60 cc. di liquido Hayem; e una di queste viene messa nella stufa a 38°. Dopo 12 ore si fa l'esame di entrambe. Il sangue freddo è discretamente conservato, vi sono però di quando in quando delle forme irregolari che hanno tante piccole sfere intorno, oppure hanno delle sporgenze irregolari, filiformi che danno loro l'aspetto strano di certe lettere giapponesi: vi sono delle forme a bozzolo o strozzate nel mezzo o stirate in forma di lagrima. Sono figure identiche a quelle che Schultze (1) descrisse e disegnò studiando le alterazioni dei corpuscoli del sangue esposto alla temperatura di 51° a 52°. Vedremo meglio in seguito che i corpuscoli rossi degli animali a sangue freddo ed a sangue caldo, presentano dei movimenti di contrazione anche alla temperatura ordinaria in condizioni speciali. Intanto non possiamo fare a meno di considerare queste forme come un effetto del liquido Hayem perchè nel cloruro sodico 0,75 per cento e nell'acido osmico 1 per cento esse mancavano completamente.

« Più gravi erano le alterazioni del sangue conservato nel liquido Hayem alla temperatura di 38° gradi. I corpuscoli rossi normali lisci ed omogenei sono molto rari; abbondano quelli finamente granulosi; alcuni coi granuli abbastanza grossi. Vi sono dei corpuscoli che sembra stieno perdendo la sostanza granulosa gialla che essi contengono, e questa ha formato degli ammassi granulosi giallognoli. Trammezzo a queste granulazioni si vedono delle ombre, ossia dei corpuscoli vuoti o scolorati. Vi sono dei corpuscoli rossi profondamente alterati nella loro forma, che rassomigliano esattamente alle figure di Schultze.

« Da queste osservazioni risulta che il bicloruro di mercurio nel liquido Hayem è contenuto in quantità troppo piccola; e che il liquido Hayem è meno atto del liquido Pacini a fissare bene ed immediatamente i corpuscoli del sangue.

« Una soluzione di sublimato corrosivo su 10,000 di acqua coagula e precipita tutta l'albumina che si trova nel siero del sangue; ma se si aggiunge la metà di acqua al liquido Hayem, benchè si abbia ancora una soluzione del 0,125 per cento di bicloruro di mercurio, questa non conserva più il sangue neppure alla temperatura ambiente. La conservazione del sangue col bicloruro di mercurio, non è dunque un semplice fenomeno di coagulazione, ma il risultato di fenomeni complessi; e neppure colle dosi elevate di bicloruro di mercurio, si riesce ad uccidere immediatamente i corpuscoli senza lasciare loro tempo di alterarsi.

« L'aggiunta del bicloruro sodico è necessaria, e diminuendone la dose ho veduto che i liquidi col sublimato corrosivo alterano maggiormente il sangue. La ragione è questa, che il bicloruro di mercurio forma delle soluzioni un po' acide e l'aggiunta di cloruro sodico diminuisce non solo questa acidità, ma rende il bicloruro di mercurio più solubile e più stabile. Non è il cloruro

(1) Schultze, *Archiv. f. mickrosk. Anat.* Vol. I, pag. 1.

di mercurio che agisce nel liquido Pacini ed Hayem, ma un cloromercurato di sodio.

« La soluzione II del liquido Pacini che contiene 1 gr. di sublimato corrosivo, per 2 gr. di cloruro sodico, è quella che soddisfa meglio a queste condizioni; ma ciò malgrado neanche questa soluzione conserva inalterati tutti i corpuscoli del sangue.

« Questo difetto dei liquidi Pacini lo si riconosce facilmente quando si rende un cane anemico con qualche salasso, e dopo si fa cadere una goccia di sangue in uno qualunque dei liquidi Pacini, o nel liquido Hayem.

« La goccia che esce dall'arteria appena tocca il liquido si raggruma e quando tocca il fondo del vaso è già coagulata. Invece il sangue normale resiste, e si spande nel liquido come una polvere leggera. Nè può dirsi che sia l'abbondanza del siero che nel sangue anemico produce questo fenomeno della immediata coagulazione, perchè è facile distinguere le granulazioni dovute al coagularsi del siero, da quelle giallognole che si producono per il disfarsi dei corpuscoli rossi meno resistenti, quando essi vengono in contatto col liquido Pacini, e col liquido Hayem.

« Un'alterazione non meno grave che subisce il sangue nel liquido Pacini, o nel liquido Hayem e lo scolorarsi dei corpuscoli gialli.

« Le soluzioni di bicloruro acide trasformano l'ossiemoglobina in metaemoglobina, ma questo l'ho veduto solo nelle soluzioni concentrate di 5 per cento, o di 1 per cento. Nel liquido Pacini l'ossiemoglobina si trasforma in una sostanza che si potrebbe confondere per il colore colla metaemoglobina, ma che non ne presenta i caratteri spettroscopici; perchè manca ogni stria delle sostanze coloranti del sangue e lo spettro è scomparso al di là del verde ed è leggermente oscurato nel resto, presentando nel verde l'ombra di una stria pochissimo marcata.

« Ho fatto anche delle ricerche colla ossiemoglobina pura; mettendone un po' nel liquido Pacini; ho veduto che questa si altera rapidamente, il liquido prende un colore giallo caffè, ed allo spettroscopio non si osserva più alcuna stria caratteristica; onde si può ritenere che la sostanza colorante del sangue siasi così profondamente alterata, da perdere affatto le proprietà ottiche dell'emoglobina e dei suoi derivati.

« Esaminando dopo qualche tempo il sangue conservato nel liquido Pacini od Hayem, si trova sempre che i corpuscoli gialli hanno una tinta molto più pallida del normale, e qualche volta sono del tutto scolorati. Di questa alterazione dell'ossiemoglobina e dello scolorarsi dei corpuscoli nel sublimato corrosivo in qualunque dose e specialmente nel liquido Hayem e Pacini, vedremo in seguito degli esempi evidentissimi. Vi sono dei corpuscoli rossi tanto delicati come quelli delle sardine e delle alici che si alterano completamente nel liquido Pacini e nel liquido Hayem, per cui il sangue diventa irreconoscibile, e scompare ogni traccia di emoglobina.

« Questo rapido scolorarsi di molti corpuscoli rossi nelle soluzioni di bicloruro di mercurio è stato causa di gravi errori, e lo dimostrerò nella seguente Nota.

« Il liquido Pacini ed il liquido Hayem hanno il grave inconveniente che coagulano il siero. Hayem temo sia caduto in errore quando dice che dagli ematoblasti esce una sostanza che vi rimane aderente. Coll'acido osmico 1 per cento non si osserva mai nulla di simile; ed io credo che la sostanza della quale parla Hayem, sia semplicemente siero del sangue coagulato dal bicloruro di mercurio.

« Dei metodi di Hayem per studiare i corpuscoli, uno altera il sangue in modo chimico, l'altro in modo meccanico. Mettendo egli il vetrino copri-oggetti ad una piccolissima distanza dal vetro portaoggetti con un po' di paraffina, in modo da produrre uno spazio capillare nel quale deve scorrere ed espandersi una goccia di sangue, necessariamente questo si altera per il contatto contro le pareti asciutte del vetro. Anche quando il vetro è già bagnato, è facile dimostrare che in tali circostanze si altera un grande numero di corpuscoli rossi. Se si prende una goccia di sangue di pesce (ad esempio di *Mustelus laevis*) e si fa toccare una goccia di soluzione di verde metile 0,2 per cento Na Cl. 1 per cento, e poi la si copre con il vetrino e si esamina (anche aggiungendovi sopra la goccia di olio di cedro per l'immersione della lente) i corpuscoli non si alterano e dopo parecchie ore sono ancora bene conservati. Se invece si mette sul vetro una goccia di sangue fresco, o per fare l'esperienza in condizioni più favorevoli, si aspetta che il sangue siasi coagulato, e dopo si prende una goccia mista con molto siero, e si ricopre con un vetrino, si vedrà alterarsi tutti i corpuscoli, appena si mette una goccia di verde metile sul bordo del vetrino, e si assorbe il liquido della parte opposta con un pezzo di carta bibula. Dopo due minuti non vi è più un solo corpuscolo normale; la sostanza gialla è scomparsa in tutti, e il nucleo si è colorato. Questa semplice esperienza dimostra che la coesione, o il movimento del sangue negli spazi capillari, ledono ed alterano i corpuscoli rossi del sangue.

Acido osmico.

« L'acido osmico, introdotto da Schultze nella tecnica istologica, è un ossidante energico che conserva i corpuscoli sanguigni meglio di qualunque altra sostanza. L'acido osmico, nella soluzione del 1 per cento, non coagula l'albumina come il bicloruro di mercurio. Se si mescola col siero trasparente del sangue di cane, in qualunque proporzione non si forma un precipitato fioccoso come succede coi liquidi Pacini ed Hayem.

« L'acido osmico all'1 per cento fa scomparire immediatamente le due strie caratteristiche dell'ossiemoglobina pura, ed in loro vece compare la stria della metaemoglobina.

« Il siero del sangue nell'acido osmico prende un colore rosso, ma se la quantità di siero è piccola come quando si mescola solo una goccia di siero con 20 cc. di soluzione di acido osmico all'1 per cento, il colore diventa giallognolo. Questo colore è dovuto all'azione degli alcali e specialmente della potassa, che produce un colore giallo rosa quando si aggiunge in quantità sufficiente.

« Il color leggermente giallo che prende una soluzione di acido osmico quando vi si fa cadere dentro una goccia di sangue, non è dunque dovuto alla perdita dell'emoglobina per parte dei corpuscoli rossi; ma dipende dalle sostanze alcaline del siero e del sangue.

« L'acido osmico 1 per cento fissa i leucociti nella forma in cui si trovano. Li rende alquanto più granulosi, ma li conserva trasparenti come nello stato normale: colla superficie irregolare, le sporgenze e le frangie sottili in tutto identiche a quanto si vedeva pochi secondi prima sotto il microscopio. È interessante che un corpuscolo bianco contrattile può morire senza aver tempo di contrarsi e formare una massa globosa: la causa di tale fenomeno deve cercarsi probabilmente nell'estrema lentezza dei movimenti protoplasmotici dei leucociti, e nell'azione rapidissima dell'acido osmico che uccide istantaneamente il corpuscolo.

« Il pus conservato nell'acido osmico mostra ancora una differenza nella colorazione dei corpuscoli, quando questi vengono sottoposti all'azione del verde metile. Vi sono dei corpuscoli, delle granulazioni e dei frammenti che si tingono in violetto, ed altri in verde, pochissimi rimangono incolori. La causa di questa colorazione dipende da ciò che la soluzione di acido osmico 1 per cento è pochissimo acida, e spesso l'aggiunta del pus o del sangue la rende neutra. Il pus conservato nell'acido acetico allungato si colorisce sempre in verde, anche nelle soluzioni molto allungate purchè siano ancora acide.

« Avremo occasione di persuaderci nelle seguenti note che l'acido osmico è, di tutte le sostanze conosciute fino ad oggi, quella che conserva meglio il colore rosso dei corpuscoli sanguigni. Il colore bruno quasi nero che prendono dopo un certo tempo le soluzioni di acido osmico, è dovuto ed un processo di riduzione: ma anche dopo un anno, quando è scomparso l'odore e la reazione caratteristica dell'acido osmico ed il sangue appare nerastro, si trova che i corpuscoli sono ancora bene conservati. Eccetto la spesa alla quale non si può badare quando si tratta di fare delle ricerche esatte, gli altri inconvenienti dei vapori irritanti, e dell'annerirsi della soluzione non mi hanno dato molestia. Anzi trovo che queste ricerche sono più comode di molte altre, perchè basta avere una serie di tubi di vetro, o di boccette col collo largo, vi si mette dentro 15 o 20 cc. della soluzione e fatto un taglio nella coda di un pesce si immerge subito il moncone nel liquido; quando si è raccolta una goccia di sangue, si tappa anche semplicemente con un sughero, e questo sangue si conserva per ulteriori studi e confronti ».

Fisiologia. — *Il sangue nello stato embrionale e la mancanza dei leucociti.* Nota XI. del Socio A. Mosso.

« Ho fatto una serie di osservazioni sul sangue dei pesci nella Stazione zoologica di Napoli. Nel riferirne i risultati incomincierò col mettere a raffronto il sangue degli animali adulti di alcuni gruppi di pesci col loro sangue nello stato embrionale e fetale.

« Mi è sembrato che questo fosse il modo più semplice per tentare la soluzione del grave problema di conoscere le differenze tra i corpuscoli giovani e quelli adulti, o decrepiti.

« Ho scelto nel gruppo degli squali la famiglia dei *Mustelus* dove la generazione si compie per mezzo di un utero e di placente simili a quelle dei mammiferi, e la famiglia dei *Scyllium* dove lo sviluppo dell'embrione si fa nelle uova fuori dell'organismo materno.

« Una femmina di *Mustelus laevis* lunga $1^{m}30$ viene portata viva nella Stazione zoologica: pesa circa 8 chilogrammi. Dissanguo incompletamente l'animale facendo un taglio alla coda, e si raccolgono in due cilindri circa 95 cc. di sangue che coagula immediatamente. Aperta la cavità dell'addome e dell'utero si estraggono 20 *Mustelus* lunghi 28 centim. che pesano circa 60 grammi ciascuno. Tagliato il cordone ombellicale e messi nell'acqua nuotano con agilità e respirano bene. Ad alcuni si taglia la coda e si raccoglie, come si fece per la madre, qualche goccia di sangue direttamente nell'acido osmico 1 per cento: di altri determino la resistenza del sangue che è circa 1,75. Na Cl. per cento di acqua. Il sangue della madre è un po meno resistente.

« Il corpo privo dei visceri pesa 5 chilogrammi; la milza solo 3 gr. 5.

« Il coagulo si disfa spontaneamente dopo 2 o 3 ore, tanto nel sangue adulto, quanto nel sangue fetale e i corpuscoli rimangono liberi nel siero.

« Il *sangue adulto* preso nella parte superiore ha i corpuscoli rossi ovali regolari; il diametro maggiore è in media di 21 μ a 23 μ, il minore di 14 μ a 16 μ. Non si vede il nucleo. Ma nella sostanza gialla del corpuscolo vi sono delle piccole macchie rotonde, trasparenti, in numero di 30 o 40, molto piccole, che si muovono: il loro diametro è minore di 1 μ.

« In alcuni corpuscoli queste macchie sono meno abbondanti e più grosse e hanno il diametro di circa 2 μ.

« Vi sono molte cellule granulose (Körnchenzellen di Leydig) circa 2 a 3 per cento corpuscoli rossi. Dimostrerò in una prossima Nota che le cellule granulose sono corpuscoli rossi in necrobiosi.

« Abbondano i leucociti, ed alla temperatura di 15° eseguiscono dei movimenti vivaci, e cambiano rapidamente di forma; sono finamente granulosi; misurano da 10 μ a 13 μ, e dentro si vede più o meno distinta la forma di un nucleo. Altri corpuscoli incolori sono rotondi e non si muovono.

« I leucociti sono così abbondanti, che ne conto da 8 a 9 per cento rossi. Nel sangue preso sul fondo del cilindro i leucociti sono meno abbondanti, ma si muovono egualmente ed hanno lo stesso aspetto e ne conto da 2 a 3 per cento di rossi. I leucociti spesso hanno delle ramificazioni e delle frangie; nessuno presenta delle goccie ialine alla superficie.

« Sono abbondanti le forme di corpuscoli, simili a quelle che Hayem descrisse col nome di ematoblasti, e rappresentò nelle tavole della sua memoria (1): poche hanno una tinta giallognola; alcune sono rotonde, ma per il maggior numero sono ovali e misurano 8 μ, 75 per 10 μ: il nucleo è omogeneo e così grande che intorno vi rimane appena uno strato corticale dello spessore di 1 μ, 5 leggermente granuloso: il nucleo è omogeneo liscio, e dentro si vedono generalmente due piccolissimi nucleoli. Molti ematoblasti sono fortemente granulosi ed alcuni si muovono, cosicchè formano dei leucociti più piccoli di quelli precedentemente descritti.

« Il *sangue fetale* lo prendo anche negli strati superiori, perchè non sia troppo denso e si trovi mescolato con del siero. La differenza nella forma dei corpuscoli rossi è così grande, che non si può confondere col sangue adulto: infatti:

« 1° I corpuscoli non sono più ovali e regolari nel loro contorno, ma un grande numero si sono accartocciati e ripiegati, in modo che formano una massa gialla conglobata colla superficie irregolare e bernoccoluta. Tale cambiamento corrisponde a quello che si osserva nei corpuscoli rossi dei mammiferi quando perdono la forma di disco e diventano sferici con la superficie irta di spine. Ritorneremo in seguito su questa alterazione: per ora constato che a differenza del sangue adulto, nel sangue fetale circa un terzo dei corpuscoli rossi perdono nelle prime ore la forma a disco e diventano conglobati.

« 2° Quasi tutti i corpuscoli rossi sono lisci ed omogenei, mentre che nel sangue adulto il maggior numero dei corpuscoli presenta delle piccole macchie e dei vacuoli nella sostanza gialla.

« 3° Mancano completamente i grandi leucociti contrattili del sangue adulto. Gli ematoblasti sono tutti scolorati: alcuni si muovono e sembrano piccoli leucociti, altri sono granulosi tondi od ovali ed immobili. Alcuni corpuscoli rossi che si sono scolorati presentano un vivace movimento dei granuli sulla sostanza corticale.

« 4° Mancano le cellule granulose (Körnchenzellen di Leydig).

« Nel sangue fetale si vede un grande numero di globetti rotondi col

(1) G. Hayem, Archives de physiologie, 1879, pag. 208.

diametro di 1 μ fino a 5 e 7 μ. Sono piccole sfere di sostanza ialina che derivano da un'alterazione dei corpuscoli. Parlerò più estesamente di questi globetti nella nota intorno al processo di necrobiosi studiato nelle cellule con ciglia vibratili.

« Dopo 24 ore il sangue della madre si è separato in due strati; quello dei corpuscoli rossi rappresenta poco più di un terzo dell'altezza totale; gli altri due terzi sono di siero giallognolo di colore dell'orina chiara. Alla superficie dei corpuscoli rossi vi è mostrato bianco spesso 3 mm. Esaminato, consta di corpuscoli scolorati finamente granulosi, rotondi. Sono rarissimi i corpuscoli rossi, abbondano le cellule granulose. Mancano i leucociti irregolari che eseguiscono dei movimenti o sono scarsissimi in confronto di jeri.

« Delle cellule granulose hanno una tinta leggermente giallognola, e viceversa dei corpuscoli rossi sono pallidi e quasi scolorati. Per buona parte questo strato bianco consta di ematoblasti, ovali o rotondi con un grosso nucleo, hanno il diametro di 7 μ a 9 μ, e sono spessi 4 o 5 μ. Lo strato corticale sottile è leggermente granuloso, il nucleo liscio o granuloso.

« I corpuscoli rossi vicini sono grossi quasi il doppio dei leucociti; solo i corpuscoli rossi più piccoli che misurano 10 μ, 5 per 10 μ. con un grosso nucleo sono quasi tutti scolorati, o sono molto meno gialli dei corpuscoli che hanno i due diametri di 14 μ per 24 μ, e nei quali non vi è traccia di nucleo.

« Nel sangue fetale sebbene io abbia raccolto insieme il sangue di tre *mustelus* in un piccolo cilindro, non vi è traccia di questo strato bianco dei leucociti; solo guardando la superficie, si vede che è meno rossa sullo strato superiore, di ciò che sia sui lati del cilindro; vi è dunque uno strato sottilissimo del quale coll'occhio non può apprezzarsi lo spessore che rappresenterebbe lo strato di 3 mm. su 45 mm. che abbiamo trovato nel sangue adulto. Prendo con grande precauzione una goccia di siero misto al sangue che sta nello strato supremo e trovo che sono metà corpuscoli rossi e metà leucociti; ma questi sono piccoli e misurano generalmente 7 μ. Alcuni conservano la forma degli ematoblasti, altri hanno delle frangie e delle sporgenze, ed eseguiscono dei movimenti vivaci. Molti corpuscoli gialli sono scolorati, e conservano nell'interno dei frammentî giallognoli. Circa la metà dei corpuscoli rossi continua ad essere globosa e bernoccoluta. È interessante di aver constatato la resistenza degli ematoblasti e la loro attitudine ad eseguire dei movimenti amebiformi. Alcuni corpuscoli che a primo aspetto sembrano leucociti di un diametro maggiore si vede che sono corpuscoli rossi scolorati.

« Esamino il sangue adulto e fetale negli strati profondi, e confermo l'enorme ricchezza di leucociti nel sangue materno in confronto del sangue fetale.

Sangue di Mustelus adulto nell'acido osmico 1 per cento

« I corpuscoli rossi sono alquanto più piccoli di quelli esaminati nel siero: il diametro maggiore oscilla fra 19 μ e 21 μ il minore fra 12 e 14 μ. La superficie e piena di macchiette e vacuoli in pochissimi è omogenea.

« Mancano i leucociti colle forme irregolari e frangiate che abbiamo veduto così abbondanti nel sangue coagulato. Le forme che più rassomigliano ai leucociti sono certi corpuscoli scolorati, omogenei, rotondi, col diametro di 12 μ finamente granulosi senza nucleo, alcuni di questi corpuscoli sono ovali e misurano 16 μ nel diametro maggiore e 14 μ nel minore.

« Abbondano gli ematoblasti; ve ne sono dei lisci e dei granulosi. Essi hanno il diametro di 8 μ a 10 μ. Tutto il corpuscolo è formato da un grande nucleo con uno strato corticale sottile: il colore giallo in alcuni è evidentissimo. Vi sono pure dei corpuscoli gialli un poco più grossi rotondi col diametro di 12 μ che hanno un grosso nucleo, e che si è incerti se si devono mettere fra i microciti o fra gli ematoblasti.

Sangue fetale nell'acido osmico 1 per cento

« I corpuscoli rossi sono meno elittici che nel sangue adulto. Qui ababbondano i corpuscoli rotondi, o poco ovali, che hanno il diametro di 12 μ a 14 μ con un nucleo di 7 μ. Quelli elittici hanno le stesse dimensioni che nel sangue adulto. Il nucleo è più grosso nei corpuscoli gialli rotondi e ha il diametro di circa 10 μ. Nei corpuscoli ovali invece è più piccolo; anche in questi, guardandoli di fianco, si vede che il nucleo forma una sporgenza da entrambi i lati come una sfera messa nel centro di un fuso. I corpuscoli adulti conservano meglio la forma di un disco e visti in profilo sono più sottili dei fetali.

« Vi sono dei corpuscoli rossi che sopra una lunghezza di 21 μ hanno dentro un nucleo rotondo del diametro di 12 μ e anche 13 μ; in generale il nucleo nel sangue fetale è maggiore che nel sangue adulto.

« Gli ematoblasti formano dei corpuscoli ovali omogenei, non granulosi. di 7 μ in trasverso per 12 μ in lunghezza. Altri corpuscoli gialli hanno le stesse forme e dentro vi è un grosso nucleo granuloso che ha il diametro di 8 a 9 μ. Si vedono tutte le forme di passaggio fra gli ematoblasti e i microciti. Gli ematoblasti più piccoli sono ovali, con un grande nucleo rotondo che li riempie nel centro, e solo alle due estremità vi è un po' di sostanza granulosa, essi misurano 8 μ, 75 per 10 μ, sono giallognoli.

« Le osservazioni sul sangue fetale sono tanto più interessanti quanto più gli animali sono giovani. Vedremo nella seguente nota che, prima di uscire dall'uovo, alcuni *Scyllium* presentano già in abbondanza delle forme decrepite di corpuscoli.

« L'esame del sangue in altri *Mustelus* che erano di alcuni mesi più giovani, mostra infatti meglio distinti i caratteri del sangue fetale.

« *Mustelus laevis*. La mattina del 1° febbraio 1888 portarono alla Stazione zoologica venti Mustelus staccati prima del parto dall'utero della madre. Su di essi ho fatto le seguenti osservazioni.

« Sono lunghi da 20 a 21 centim. e parecchi hanno ancora un pezzo del cordone ombellicale aderente all'addome, che sporge per la lunghezza di 5 a 6 millimetri. Messi nell'acqua nuotano, ma sono poco vivaci.

« Esamino subito il loro sangue e ne metto nell'acido osmico 1 per cento e nel liquido Pacini e nel liquido Hayem.

« Alcuni muoiono dopo 3 o 4 ore, parecchi resistono fino al giorno seguente, ma dopo 48 ore sono tutti morti. Taglio la coda ad uno, e tocco col vetro porta oggetti la goccia che esce. Ricopro subito col vetrino, ed esaminando vedo che i leucociti sono quasi la metà in numero dei corpuscoli rossi; ma è facile accorgersi che questo è un sangue alterato per il contatto col vetro: perchè oltre ai nuclei liberi, vi sono molti corpuscoli rossi deformati, col nucleo in posizione eccentrica; ed in altri il nucleo sta per uscire; vi sono dei corpuscoli rossi scolorati e dei nuclei che hanno intorno dei frammenti di sostanza corticale, come goccioline gelatinose giallognole.

« Che il sangue preparato nel modo comune, come indicai or ora, fosse profondamente alterato, potei subito assicurarmene esaminando il medesimo sangue raccolto nel liquido Pacini e meglio ancora nell'acido osmico 1 per cento mentre usciva dalla coda.

« Ripeto parecchie volte questa osservazione, incidendo diversi Mustelus, e sempre trovo che il numero dei leucociti è straordinariamente grande se tocco col vetro la goccia di sangue che esce dalla coda e poi la ricopro col vetrino. E assai minore se metto prima una goccia di cloruro sodico 0,75 per cento sul portaoggetto e tocco con questa goccia il sangue, e mancano completamente i corpuscoli bianchi se raccolgo il sangue nei liquidi fissatori.

« *Acido osmico 1 per cento*. Il sangue di Mustelus messo direttamente in questo liquido ha i corpuscoli gialli più tondi, cioè meno elittici che il sangue dei Mustelus adulti. I corpuscoli rotondi, o quasi rotondi, costituiscono circa un quarto dell'intero numero dei corpuscoli.

« Nell'acido osmico 1 per cento i corpuscoli hanno delle dimensioni un poco inferiori a quelle del sangue fresco; ossia nel sangue senza l'aggiunta di liquido, la lunghezza dei corpuscoli gialli varia in media fra i 20 μ e 24 μ e la larghezza fra i 10 μ, 6 e 14 μ, 3. Nell'acido osmico i corpuscoli che hanno 21 a 22 μ di lunghezza per 10 o 12 μ di larghezza sono

abbastanza rari; generalmente i più grossi hanno 17 e 18 μ di lunghezza e 10 a 12 μ di larghezza.

« Paragonando questo sangue con quello di un Mustelus adulto conservato nell'acido osmico, si vede nel Mustelus adulto sono assai più lunghi, ossia più elittici, mentre che nel sangue giovane sono più circolari.

« Un'altra differenza caratteristica è nel rapporto fra la grossezza del nucleo e del corpuscolo. Mentre nel sangue adulto il rapporto del diametro trasverso dell'intero corpuscolo sta a quello del nucleo come 3 ad 1, o poco meno, nel sangue fetale sta solo come 2 ad 1.

« Vi sono dei corpuscoli gialli rotondi, o leggermente ovali, che hanno il diametro di 12 μ a 15 μ e dentro un nucleo di 10 μ, oppure un corpuscolo giallo lungo 17 μ 3 e largo 12 μ contiene un nucleo lungo 13 μ, 3 e largo 10 μ 6: e questo nucleo è più omogeneo e più liscio dei nuclei minori che generalmente sono granulosi con delle macchie irregolari e scure.

« Questi corpuscoli con nucleo molto grosso sono abbastanza comuni.

« I corpuscoli del sangue adulto formano un disco come la tesa di un cappello; la coppa è rappresentata dal nucleo che sporge come una mezza sfera da un lato oppure da entrambi i lati. Visto di fianco il corpuscolo giallo rassomiglia ad un fuso che ha lo spessore di 2 μ, 5 e porta nel mezzo un globo, ossia il nucleo, che ha il diametro generalmente inferiore ai 4 μ.

« Nei giovani corpuscoli invece questa massa centrale è molto grossa 6 μ fino ad 8 μ; in alcuni questo nucleo centrale è così rigonfiato che forma una massa globosa di 9 μ di diametro, che rassomiglia al gambo di un fungo dove la coppa rappresenta il disco giallo del corpuscolo.

« Queste forme sono caratteristiche, vedute di fianco rassomigliano a dei fusi gialli lunghi 17 μ a 20 μ, spessi 5 μ a 7 μ con una grossa sfera nel mezzo, del diametro di 8 μ a 10 μ; e veduti di fronte hanno la forma comune di dischi elittici con un nucleo nel mezzo.

« Qualche volta il nucleo per effetto dell'acido osmico si gonfia tanto che scoppia, e si formano alla superficie dei lembi e delle frangie come quando si soffia una bolla fusa di vetro che si fa scoppiare. Colle ineguaglianze prodottesi alla superficie i nuclei rigonfi si attaccano insieme e formano delle catene di 5 o 6 corpuscoli o dei mucchi di corpuscoli.

« Quando due si toccano e sono così strettamente attaccati che anche scorrendo non si separano, e resistono agli urti, guardando nel punto di congiunzione non si vede nulla; i nuclei sono fusi in una massa trasparente dove manca ogni particolarità di struttura.

« Nel sangue adulto vi sono dei corpuscoli che hanno il nucleo grosso e globoso, ma sono rari e meno grossi e non scoppiano a questo modo.

« Le differenze fra il sangue embrionale e quello adulto sono dunque:

« 1° La forma più rotonda dei corpuscoli giovani;

« 2° La grossezza maggiore del nucleo;

« 3° La tendenza a gonfiarsi ed a scoppiare nell'acido osmico 1 per cento.

« Ma la differenza più caratteristica è la mancanza dei leucociti nel sangue embrionale e fetale, che ho costatata pure negli embrioni dei mammiferi.

« Il sangue fetale di *Mustelus laevis* conservato nell'*acido osmico* 1 per cento contiene nè corpuscoli bianchi, nè cellule granulose, nè ematoblasti scolorati. Si vede qualche elemento ovale che misura 6 μ, 6 per 10 μ, 6 senza nucleo, ma anche questi corpuscoli sono gialli. Altri sono più grossi, leggermente ovali coi due diametri di 9 μ, 3 per 8 μ, oppure sono rotondi col diametro di 8 μ e sono intensamente gialli. Nè vedendo la mancanza di leucociti può credersi che siansi distrutti, perchè non si trovano nè granulazioni, nè frammenti. Anche cercando negli strati più superficiali dove generalmente galleggiano i leucociti, non si trovano che corpuscoli rossi. I più pallidi sono le grandi cellule ovali con grosso nucleo omogeneo, ma anche essi hanno una tinta giallognola.

« La superficie dei corpuscoli gialli è liscia ed omogenea nella parte corticale; alcuni hanno delle macchiette bianche o scure a seconda che si alza o si abbassa il tubo del microscopio. Queste macchie sono rotonde in numero di 5 o 6 sparse irregolarmente alla superficie del corpuscolo, spesso in numero assai maggiore, ma sono sempre piccole in modo che non superano 0,4 μ e 0,6 μ di diametro.

« Il tipo dei corpuscoli non è quello di un disco, ma di una sfera con un anello intorno. Guardando il nucleo di fronte, a primo aspetto sembra una massa costituita da frammenti filiformi, ma se si esamina bene il nucleo di fianco si vede che queste linee scure sono coaguli irregolari sospesi in una sostanza omogenea, ed alcune volte formano delle frangie irregolari che dalla base del nucleo sopra il disco anulare si dirigono verso la parte culminante del nucleo che è più omogeneo.

« *Nel liquido Pacini* i corpuscoli rossi di questi feti di *Mustelus laevis* hanno in media il diametro maggiore di 21 μ e l'altro di 10 μ, ed il nucleo di 5 μ, 25; ma vi sono anche dei nuclei di 8 μ dentro un corpuscolo di 10 μ, 5. Nei corpuscoli ovali lunghi, è dove i nuclei sono più piccoli e in media misurano 3 μ,5; invece nei corpuscoli rossi più rotondi si vedono dei nuclei ovali che hanno il diametro di 7 μ per 10 μ,5: e questi grandi corpuscoli rossi che misurano 17 μ a 18 μ sono appiattiti, per cui hanno la forma di un disco come i corpuscoli rossi normali. Si può ritenere come un fatto dovuto ai liquidi conservatori, se i corpuscoli nell'acido osmico 1 per cento hanno il nucleo più gonfio che non quelli conservati nel liquido Pacini.

« Un'altra differenza che però va a danno del liquido Pacini, è che in esso i corpuscoli rossi diventano più granulosi; in moltissimi si vede una punteggiatura di macchiette chiare e scure, sparse irregolarmente come una granitura leggiera, e il nucleo presenta delle granulazioni più forti che rendono il contorno un po' irregolare e meno netto. Vi sono dei corpuscoli rossi che hanno

una estremità acuminata e l'altra rotonda, e di quelli che rassomigliano ad un fuso, perchè entrambe le estremità sono stirate in punta.

« L'alterazione più singolare è quella dei corpuscoli rossi che hanno nel mezzo uno strozzamento più o meno forte, così che prendono la forma come di una bisaccia o di una borsa, essendo il corpuscolo diviso in due parti rotonde eguali o differenti per mole che stanno riunite da un tratto di sostanza gialla. Su queste forme sottili, che furono già descritte da Bizzozero, ritornerò in seguito perchè le osservai frequentemente nel sangue dei pesci.

« Che il liquido Pacini alteri il sangue fetale del *Mustelus laevis* lo si vede con facilità, perchè frammezzo ai corpuscoli vi sono nel liquido non solo delle granulazioni bianche, che potrebbero essere prodotte dalla coagulazione del siero, ma si vedono anche delle granulazioni gialle che certo sono frammenti di corpuscoli rossi disfatti; e frammezzo a queste granulazioni vi sono dei nuclei bianchi omogenei ovali o rotondi con un diametro di 5 a 6 μ. Anche qui mancano i leucociti, o sono rarissimi, e invece sono discretamente comuni le forme scolorate simili a quelle descritte da Hayem col nome di ematoblasti.

« Il paragone del sangue di *Mustelus* conservato nel bicloruro di mercurio colle soluzioni di Pacini o di Hayem, ci dà il modo di convincersi che il colore del sangue adoperato come base di classificazione è un criterio instabile e fallace. Mettendo a raffronto il sangue conservato nell'acido osmico al 1 per cento e quello che venne in contatto col liquido Pacini o col liquido Hayem, noi vediamo che il sublimato corrosivo ha scolorato, deformato e distrutto molti corpuscoli rossi che nell'acido osmico conservano ancora una tinta giallognola. È solo coll'uso di reagenti più sicuri che ci metteremo in grado di conoscere quale sia la natura degli elementi morfologici costitutivi del sangue, e quali le forme dei corpuscoli prodotti artificialmente o dai reattivi, o dalle condizioni anormali della vita dei corpuscoli per un arresto o un rallentamento della circolazione.

« Nel sangue di questi Mustelus e in quello di altri pesci di cui parlerò in appresso, ebbi modo di persuadermi che le forme acuminate, a bisaccia, o strette nel mezzo come una cifra ad 8, o stirate come se avessero una coda od un flagello e tutte le altre forme di corpuscoli scoloriti che Hayem descrisse come ematoblasti, sono semplicemente dei corpuscoli rossi alterati. E nel medesimo sangue si osservano delle forme eguali per struttura e per forma che talora sono gialle e talora completamente scolorite, come ad esempio i corpuscoli rotondi od ovali di 8 a 9 μ che hanno un nucleo di 5 a 6 μ.

« Che gli ematoblasti siano delle forme alterate lo si conosce facilmente dalle estremità acuminate, stirate come lagrime di vetro; nei vedremo che questa è una forma assai comune nei corpuscoli rossi che si alterano per una ragione qualsiasi. Questi elementi fusiformi che hanno delle code lunghe con un nucleo ovale omogeneo, o rotondo, che qui appaiono scolorate, le

vedremo abbondanti in altri animali e perfettamente colorate in giallo; l'essere scolorate è un grado maggiore di alterazione e non un carattere per farne un elemento speciale. Infatti, anche in questo sangue si vedono tutti i passaggi dalle forme gialle a quelle scolorate. È particolarmente nello studio di queste forme intermedie che si riconosce l'affinità degli elementi che gli istologi moderni tendono a disgiungere.

« Finchè si tratta di riconoscere un corpuscolo rosso, non vi è alcuna difficoltà, sia esso tondo od ovale, col nucleo piccolo o grande: la interpretazione diviene controversa solo quando si tratta di classificare le forme che possono a piacimento mettersi o fra i leucociti o fra le piastrine o fra gli ematoblasti.

« Quando incontriamo un corpuscolo bianco di 8 μ a 9 μ, se è rotondo non si può per questo solo metterlo fra i leucociti. Se ha un grosso nucleo con sottile sostanza corticale e dentro al nucleo omogeneo uno o due nucleoli, io lo metterei fra le giovani cellule; se invece si tratta di un corpuscolo bianco con eguale diametro che ha dentro un nucleo irregolare o multiplo, io lo metterei fra le cellule in necrobiosi, cioè fra i leucociti.

« La struttura del corpuscolo e la forma del nucleo deve essere la base della classificazione dei corpuscoli, perchè il colorito e la forma possono variare e mutarsi per molti accidenti.

« Infatti Hayem confuse coi leucociti delle forme che sono a mio parere diverse per loro natura, e che stanno piuttosto nella categoria dei corpuscoli giovani, o degli ematoblasti; e viceversa fondandosi sul criterio fallace della sua classificazione egli diede il nome di ematoblasti a degli elementi che non sono più germi di corpuscoli rossi, ma corpuscoli alterati che diventarono fusiformi ».

Fisiologia. — *Il sangue embrionale di Scyllium catulus.* Nota XII. del Socio A. Mosso.

« Dovendo fare una serie di comunicazioni sul sangue dei pesci, non starò a ripetere per ciascuna specie che ho studiato, tutte le cose che ho già riferito parlando del sangue di specie affini. Per brevità cercherò di svolgere in ogni Nota un gruppo di osservazioni che mettano in evidenza qualche fatto generale: e passerò in silenzio le cose che ho già dette, o che dovrò analizzare più estesamente nelle Note successive.

« Il 27 gennaio 1888 viene portato alla stazione zoologica di Napoli un uovo di *Scyllium catulus* pescato alla profondità di 50 m. circa. Apro il guscio e ne estraggo un pesce lungo 14 centim. che fa dei movimenti vivaci.

« Il sig. Lo Bianco mi disse che questo pesce aveva l'età di circa sei mesi, e che fra una settimana, o due, sarebbe uscito dal guscio. Taglio la coda dell'animale e raccolgo una goccia di sangue nel liquido Pacini: taglio un'altra volta la coda e la immergo nell'acido osmico 1 per cento, per mettere immediatamente il sangue in contatto col liquido fissatore.

« Dopo determino la resistenza del sangue; ne prendo una goccia nella soluzione di cloruro sodico al 0,75 % all'1 per cento e all'1,5 per cento. Altre esperienze fatte prima sul sangue dei *Scyllium canicula* mi avevano già mostrato che tale è il titolo delle soluzioni che alterano meno i corpuscoli rossi dei pesci cani.

« Infatti parecchie ore dopo che ho messo il sangue in queste soluzioni di cloruro sodico, vedo che nel liquido al 0,75 e all'1 per cento vi è una leggera colorazione rossa, mentre che il liquido all'1,5 per cento è trasparente e scolorato ed i corpuscoli si sono depositati sul fondo. Si può dunque ritenere che la resistenza di questo sangue è tra 1 e 1,5. Il sangue coagula rapidamente; anche nell'acido osmico 1 per cento e nel liquido Pacini forma un grumo, e non si mescola come una polvere sottile: e nel deposito che si forma sul fondo del vaso vi sono dei piccoli grumetti di sangue non sciolto.

« All'autopsia trovo che la milza è rossa e bene sviluppata. Le cellule che stanno nel plasma della milza trattate col verde metile si coloriscono immediatamente in verde (1).

(1) Queste ed altre osservazioni verranno esposte in una delle seguenti Note dove parlerò delle ricerche che feci sul sangue della milza e sulle funzioni di quest'organo.

« *Acido osmico 1 per cento.* I corpuscoli gialli sono generalmente elittici: e il loro diametro maggiore varia fra 22 μ, 75 e 24 μ, 50: il minore fra 10 μ, 5 e 12 μ, 25. Ve ne sono anche dei meno allungati che misurano 21 μ, per 10 μ, 5.

« Guardando un corpuscolo di fianco, nel maggior numero dei casi si vede che il nucleo fa una sporgenza rotonda da un lato e dall'altro del disco, per cui si ripetono le forme che ho già descritto nel precedente capitolo parlando del sangue di *Mustelus*.

« La superficie dei corpuscoli gialli è finamente macchiettata. Sono piccole macchie rotonde e chiare, quasi trasparenti, che in alcune posizioni del microscopio appaiono scure o gialle, perchè essendo scolorite riflettono il color giallo della sostanza del corpuscolo in cui stanno racchiuse. Il loro diametro è di 0,2 μ a 0,3 μ in media, sono disposte irregolarmente in numero di 25, o 50 o 100 per ogni corpuscolo. Spesso sono molto vicine le une alle altre, in modo che la superficie del corpuscolo sembra un crivello, o rassomiglia alle foglie pertugiate di alcune piante come l'*Hypericum perforatum*. Ritornerò a parlare di queste macchie in seguito.

« Dentro ai corpuscoli si vede un nucleo ovale, spesso in posizione eccentrica od obliqua, qualche volta sta nel mezzo, e il suo diametro maggiore e minore corrispondono a quelli del corpuscolo. In questo caso si vedono dei corpuscoli che hanno intorno al nucleo come un alone, od un margine chiaro. Questo fatto lo si deve attribuire alla sottigliezza maggiore che ha la sostanza del corpuscolo intorno al nucleo: e di ciò uno può assicurarsi facilmente esaminando questi corpuscoli di profilo, che mostrano una infossatura circolare intorno al nucleo.

« Fra i corpuscoli rossi ve ne sono di tre specie: quelli lisci ed omogenei, quelli macchiettati, e quelli granulosi: in questi ultimi la sostanza del corpuscolo è come spugnosa e generalmente non lasciano vedere il nucleo. Nei corpuscoli lisci invece si vede che il nucleo è fortemente granuloso. Questi corpuscoli omogenei hanno generàlmente un volume più piccolo di quelli che sono spugnosi.

« Vi sono dei piccoli corpuscoli gialli ovali che misurano 10 μ, 5 per 7 μ e hanno dentro un nucleo di 3 μ, 5: alcuni sono maggiori e visti di fianco rassomigliano ad un fuso lungo 12 μ a 14 μ con un nucleo di 8 μ a 10 μ. Ve ne sono che hanno la lunghezza di 17 μ con un nucleo di 10 μ.

« La nota caratteristica di questi microciti è la grossezza del nucleo che quasi tocca il bordo esterno del corpuscolo, o non vi rimane separato che da uno strato sottile della corteccia gialla. Cosicchè solo dal lato dell'asse maggiore vi è un po' di sostanza corticale leggermente granulosa. Spesso, invece di essere elittici sono quasi rotondi, e allora formano una cellula leggermente gialla costituita da un nucleo omogeneo di 10 μ che contiene dentro uno, o due nucleoli splendenti, che hanno il diametro da 0,6 μ a 1 μ e intorno a questo grande nucleo vi è uno strato di sostanza granulosa spesso 1 a 2 μ.

« Alcuni di questi corpuscoli hanno la figura di un elissoide con un diametro di 24 μ per 17 μ, e ve ne sono dei più piccoli e di varie forme; alcuni di questi grandi nuclei sono elittici e molto allungati, cosicchè formano un corpuscolo di 21 μ per 10 μ; in essi la sostanza corticale forma uno strato dello spessore di 1 μ, 75, tutto il resto è nucleo omogeneo.

« I più piccoli misurano da 8 μ a 10 μ; sono molto pallidi, ma visibilmente gialli. Di tali corpuscoli in questo sangue ne ho contato da 10 a 15 per cento corpuscoli ordinari.

« La colorazione gialla di questi corpuscoli, il grande nucleo omogeneo che quasi li riempie, e la presenza di uno o due nucleoli, fanno di questi corpuscoli un tipo speciale che non li lascia confondere cogli altri.

« Io li considero come corpuscoli giovani, e fino a che non venga meglio chiarita l'origine dei corpuscoli rossi, anzichè chiamarli col nome di ematoblasti o di piastrine, per evitare confusione credo sia meglio designarli colle loro note caratteristiche. Anche il nome di microciti non serve, perchè abbiamo dei corpuscoli giovani che sono grossi quanto i corpuscoli rossi adulti, e ve ne sono anche dei maggiori. La grossezza del nucleo, ed i suoi rapporti colla sostanza corticale, sono a mio parere i criterî più sicuri per procedere ad una classificazione dei corpuscoli. Noi vediamo infatti che dai più piccoli, dove tutto è nucleo, esiste una serie ascendente di forme nelle quali la sostanza corticale diventa sempre più sviluppata.

« Il nucleo cresce finchè raggiunge un limite massimo e poi diminuisce: in questo secondo periodo, nel quale il nucleo si riduce, diviene più spiccata la forma a disco dei corpuscoli adulti.

Corpuscoli rossi deformati.

« I corpuscoli rossi si alterano e cambiano di forma colla più grande facilità, specialmente nel sangue embrionale. Qui infatti si trovano molti corpuscoli gialli che da una parte sono tirati in punta. Queste punte alcuni le hanno da entrambe le estremità, talora sono diritte e qualche volta sono piegate leggermente ad uncino. Questi corpuscoli hanno la forma come di una lacrima di vetro coll'estremità sottile curva o diritta; alcuni presentano due strozzamenti per cui da una parte il corpuscolo ha la sua convessità normale; poi viene un leggero strozzamento che abbraccia il nucleo e questa seconda parte del corpuscolo si restringe un po' e quindi termina come un filo: in alcuni comparisce una terza leggera espansione; cosicchè questi corpuscoli prendono il profilo di certe lancie antiche col bordo sinuoso. Tali corpuscoli che hanno tre strozzamenti sono quelli che dimostrano con maggior evidenza la natura del processo che produce le forme irregolari. Non si tratta qui di un fatto fisiologico di scissione che serva alla riproduzione dei corpuscoli sanguigni, ma di un fatto morboso, o di un'alterazione cadaverica, che appare solo quando il sangue si trova in condizioni anormali.

« Che del resto l'acido osmico non basti per fissare immediatamente tutti i corpuscoli rossi nello stato in cui si trovano uscendo dai vasi, lo prova il fatto di trovare, in questo medesimo liquido, dei corpuscoli molto più deformati, che quasi non sono più riconoscibili, tanto sono accartocciati; essi formano come una pallottola gialla con sporgenze irregolari; altri corpuscoli sono diventati fortemente granulosi.

« Le modificazioni che subisce il sangue quando esce dai vasi, è la parte che ho meglio studiato in queste ricerche. A tale scopo fissavo i corpuscoli dentro i vasi immergendo le branchie nell'acido osmico 1 per cento, oppure facendo con esse dei preparati nel semplice cloruro di sodio. Questo esame deve farsi sempre, perchè è la pietra di paragone, e non considero come elementi normali del sangue se non quelli che osservo e studio entro ai vasi sanguigni.

« Servendosi di questo controllo, è facile assicurarsi che i corpuscoli rossi si alterano profondamente appena escono dal loro ambiente naturale e toccano degli oggetti, o dei liquidi. La sostanza del corpuscolo rosso essendo contrattile, come dimostrerò meglio in seguito, si restringe in alcune parti e produce delle forme che rassomigliano ad un rene, ad una patata, o ad altre cose, che abbiano delle infossature e delle sporgenze: se lo stringimento è circolare, ne risulta una strozzatura, che può essere centrale o laterale, che può abbracciare il nucleo, o lasciarlo intatto; così si producono dei corpuscoli che nel profilo rassomigliano ad un 8, o ad una borsa a maglia, ecc.

« È stato Bizzozero il primo che ha descritto queste forme di corpuscoli nella Memoria da lui presentata a questa Accademia il 2 dicembre 1883 insieme al dott. Torre. Credo indispensabile citare un passo di questo importante lavoro:

« Tra i globuli rossi dei ciprini, ed anche di qualche individuo degli « altri pesci da noi esaminati, trovammo talvolta degli elementi che meri- « tano particolare menzione (fig. 4). In qualche caso essi erano abbastanza « numerosi; in preparati di sangue o di milza dei ciprini talora ne con- « tammo uno o due per ogni campo di microscopio. Gli elementi in que- « stione sono di differente aspetto. Alcuni sono in tutto simili ai soliti glo- « buli rossi adulti salvo che nel nucleo, il quale invece di essere ovale, ha « uno strozzamento equatoriale che lo fa rassomigliare ad un 8. In altri la « cellula è essa pure allungata e strozzata equatorialmente, e le due metà « del nucleo non aderiscono fra loro che per un filo. Se ne vedono altre « ancora, in cui le due metà del corpo cellulare sono allontanate l'una « dall'altra, contenenti ciascuna un nucleo e riunite fra di loro per un pe- « duncolo colorato debolmente dall'emoglobina, od anche incoloro, ora di- « ritto ora curvo in modo da dare all'elemento la forma di bisaccia.

« Non possiamo negare che questi elementi ci hanno fortemente im- « pressionati, e che, per quanto ci ripugnasse d'ammettere che nei pesci la « scissione dei globuli rossi decorra in modo diverso dagli altri vertebrati,

« ci abbiano fatto travedere la possibilità che in questi animali i globuli « rossi si moltiplichino per scissione *diretta*. D' altra parte, però, il fatto « che esse ci occorsero quasi soltanto nei ciprini, non è favorevole alla sup- « posizione che esse ci rappresentino una forma fisiologica costante dell'or- « ganismo dei pesci ».

« Nelle figure che diede il prof. Bizzozero di questi corpuscoli rossi colla forma di bisacce, il nucleo è diviso da uno strozzamento, oppure vi sono due nuclei nelle due metà del corpuscolo. Questo è il caso più comune; ma nel sangue dei selaci e dei teleostei ho potuto assicurarmi che non succede sempre così e che il nucleo può restare tutto da una parte, e dall'altra non vi è che sostanza gialla.

« Il dubbio espresso dal prof. Bizzozero che non si tratti qui di una forma fisiologica, venne pienamente confermato dalle mie osservazioni. Infatti io non ho mai riscontrate tali forme nei vasi sanguigni, ed ho invece veduto che si producono in abbondanza quando espongo il sangue a degli agenti energici, che mettono in azione la contrattilità dei corpuscoli rossi. È specialmente nel liquido Kleinenberg e nel liquido Pacini che si produce più facilmente questa alterazione dei corpuscoli rossi che Bizzozero paragonò giustamente alla forma delle bisacce. Siccome osservai le medesime forme anche negli animali a sangue caldo, ritornerò nelle seguenti Note su questo argomento, quando parlerò del sangue embrionale degli uccelli e dei mammiferi (1).

Cellule granulose.

« Leydig (2) distinse per il primo nel sangue dei Selaci tre specie di cellule, cioè: 1° i corpuscoli ovali e colorati, 2° i corpuscoli senza colore, pallidi e rotondi e 3° le cellule granulose (Körnchenzellen) che sono due volte più grosse dei corpuscoli incolori.

« La caratteristica del sangue embrionale è la scarsità, o la mancanza dei leucociti, e la presenza di cellule granulose gialle; così almeno risulta da tutte le osservazioni che ho fatto fino ad ora.

« Lasciando un preparato di sangue fresco due ore sotto il microscopio, il numero delle cellule granulose diventa maggiore, perchè vi sono dei corpuscoli

(1) Il prof. Mondino e il dott. L. Sala pubblicarono recentemente una Memoria *Sulla produzione delle piastrine nel sangue dei vertebrati ovipari*, Palermo 1888, intorno alla quale avevano presentato una Nota all'Accademia dei Lincei nella seduta dell'8 aprile scorso. Le figure che essi diedero mi fanno l'impressione che non si tratti di un processo fisiologico di scissione delle piastrine, ma semplicemente di un'alterazione a bisacce di alcuni corpuscoli sanguigni della rana. Per togliermi questo dubbio dovrò prima assicurarmi che tali forme in scissione esistono dentro i vasi sanguigni e questo fino ad ora, nè a me, nè ad altri è stato possibile di osservarlo.

(2) F. Leydig, *Lehrbuch der Histologie*, pag. 450.

che si scoloriscono; specialmente nel cloruro sodico scomparisce presto l'emoglobina. Abbiamo dei corpuscoli rossi scolorati che rimangono lisci, ed altri in cui la sostanza corticale diventa granulosa, per cui si formano delle cellule rotonde di 14 μ che rassomigliano ai leucociti.

« Vi sono delle cellule granulose di colore giallognolo che hanno i granuli in movimento, come ho già descritto per le granulazioni piccole e grandi dentro ai corpuscoli del pus e nei corpuscoli rossi in degenerazione.

« L'origine e la struttura delle cellule granulose nel sangue dei Selaci le studierò minutamente in una prossima Nota; qui si vede che la loro tinta giallognola è un residuo dell'emoglobina del corpuscolo rosso primitivo, non una semplice imbibizione colla emoglobina che possa esservi nel siero. Le cellule finchè si muovono non assorbono emoglobina, e anche quando sono immobili non mi è riuscito di tingerle coll'ossiemoglobina sciolta nel siero, od in altri liquidi. Su questo fatto, che ha una grande importanza per la mia dottrina della necrobiosi dei corpuscoli rossi, ritornerò in seguito.

« Le traccie evidenti di color giallo nelle cellule granulose mi inducono a ritenere che questi elementi derivino dai corpuscoli rossi. Un altro argomento si impone subito agli occhi, ed è la forma di alcune cellule granulose, che conservano esattamente le dimensioni e la forma dei corpuscoli rossi.

« Vi sono delle cellule granulose che sembrano avere due nuclei; invece guardandole meglio si vede che hanno un nucleo solo piegato come un C; in altri il nucleo è piegato come una lettera S. Queste cellule nel sangue embrionale del *Scyllium* sono quelle dove si vede la maggiore irregolarità dei nuclei; in alcune si ripetono i medesimi strozzamenti e le medesime forme a bisacce che abbiamo riscontrato nei corpuscoli rossi.

« Siccome si trovano delle cellule granulose che hanno un nucleo grande e di quelle invece che hanno il nucleo piccolo, credo dover supporre che il fatto dello scolorirsi, e del diventare granuloso sia un processo di morte che attacca gli elementi giovani e gli elementi vecchi del sangue. Questo mi pare ragionevole ed io non saprei spiegare in altro modo i fatti osservati.

« Fino a che si tratta, come succede qui, di una alterazione del sangue fuori del suo ambiente naturale, non è una grave complicazione che i corpuscoli giovani e quelli vecchi muoiano della stessa malattia. Il problema ci sembrerà più complesso, quando fra poco vedremo delle forme granulose dentro i vasi sanguigni, le quali ci assicurano che vi è un processo comune di necrobiosi che attacca non solo i corpuscoli decrepiti, ma anche gli adulti ed i giovani; per cui alcune di questi cessano di vivere, prima di essere giunti alla loro completa maturità.

« Nel sangue embrionale di *Scyllium* ho trovato qualche leucocito che si muoveva, e colla camera lucida ho potuto disegnare tutti i cambiamenti del suo profilo. Uno lo seguii dall'apparizione di uno strozzamento centrale, fino all'ultima fase in cui vi erano due masse eguali, globose, che sembravano staccate, senza però essere divise.

« Non mi è mai capitato di osservare una scissione completa, in modo che le due metà del corpuscolo si separassero l'una dall'altra. Ho veduto spesso dei nuclei che sgusciavano dall'interno della sostanza corticale, ma non ho veduto ancora una cellula contrattile, o un corpuscolo rosso separarsi in due metà, quantunque la cosa sia possibile, perchè altri l'ha già osservato.

« Nel verde metile le cellule granulose diventano violette; alcune hanno il nucleo verde e la sostanza granulosa violetta. I corpuscoli gialli hanno pure il nucleo violetto, mentre che i corpuscoli rossi scoloriti l'hanno verde.

« Il fatto che i leucociti sono meno abbondanti nel sangue durante la vita fetale e mancano completamente nell'embrione, è un fatto che viene in appoggio alla dottrina della necrobiosi dei corpuscoli rossi. L'epoca nella quale compaiono i primi leucociti nel sangue fetale, ci indicherebbe presso a poco la lunghezza della vita dei corpuscoli rossi; perchè i leucociti io li considero come elementi decrepiti e forme cadaveriche.

« L'esistenza di soli corpuscoli rossi nel sangue embrionale, mi obbliga a fare altre considerazioni ed entrare in un campo assai controverso. Non intendo di svolgere la letteratura di questo argomento. Il Socio Bizzozero presentò a quest'Accademia una sua Memoria molto interessante *sulla produzione dei globuli rossi*, e non ho da aggiungere nulla a quanto egli ha già detto (1).

« Dopo lo scritto di Bizzozero, M. Löwit (2) con una serie di lavori sostenne il concetto primitivo di Kölliker, che i corpuscoli rossi derivano da cellule prive di emoglobina. Certo nella sua primissima origine il sangue deve derivare da cellule bianche, ma non è men vero, che dentro i vasi sanguigni del pulcino nel quarto giorno non se ne trovano più, e anche nell'embrione del coniglio, quando è lungo 10 mm. non ho più veduto delle cellule bianche, e nei pesci mancano pure i leucociti nel sangue embrionale.

« Non è possibile fare rapidamente un cenno delle ricerche di Löwit, tanto sono numerose e svariate le sue osservazioni; ma è facile dimostrare che probabilmente egli non ha osservato il sangue in condizioni normali. Infatti per lo studio della linfa e del sangue egli adopera un liquido che scolorisce completamente i corpuscoli rossi (3). Non tiene conto delle alterazioni di contatto, e prende il sangue dal cuore con un schizzetto di Pravaz, oppure essica il sangue col metodo di Ehrlich e lo riscalda fino a 110° o 120°,

(1) G. Bizzozero, Memorie dell'Accademia dei Lincei, XVIII, 2 dicembre 1883.

(2) M. Löwit, Sitzungber. d. k. Akad. d. Wiss. in Wien 1883. Bd. 88, III, Abth. p. 356. Bd. 92, III, Abth. p. 22 Bd. 95. III Abth. März 1887.

(3) A, 5 a 6 cc. di una soluzione di cloruro sodico all'1 per cento. Löwit aggiunge 3 a 6 goccie di una soluzione allungata del miscuglio di Flemming che ha la seguente composizione: acido cromico 1 per cento, 30; acqua, 30; acido osmico 2 per cento, 8; acido acetico 2.

oppure adopera un liquido fissatore che scolorisce ugualmente molti corpuscoli rossi. Löwit dice che è il liquido Pacini modificato; a me sembra piuttosto una modificazione del liquido Hayem, colla differenza in peggio che contiene meno bicloruro di mercurio; infatti esso consta di 300 cc. di acqua; cloruro sodico 2 gr.; solfato di soda 5 gr.; sublimato corrosivo 5 cc. di una soluzione satura a freddo. Siccome alla temperatura ordinaria di 15° il bicloruro di mercurio si scioglie nella proporzione di circa 7 gr. in 100 gr. di acqua, il liquido di Löwit contiene una dose di sublimato corrosivo che è inferiore alla metà di quella del liquido Hayem. Ho già dimostrato nella Nota X. che la dose del bicloruro di mercurio è insufficiente nel liquido Hayem; e quanto ho già detto in proposito, vale a *fortiori* pel liquido di Löwit. Infatti paragonandolo colla soluzione di acido osmico 1 per cento, è facile persuadersi che altera molti corpuscoli del sangue e li scolorisce.

« Le discrepanze e le contraddizioni degli autori dipendono dalla differenza dei metodi adoperati nello studio del sangue, e la concordia potrà solo stabilirsi quando siasi perfezionata la tecnica in modo da fissar bene i corpuscoli del sangue senza alterarli colle manipolazioni.

« Hayem ebbe il grande merito di aver messo le basi delle ricerche sull'evoluzione dei corpuscoli del sangue. Non sono d'accordo con lui su tutti i punti; ho gia detto che egli ha confuso i leucociti cogli ematoblasti, e viceversa una differenza da lui stabilita fra gli ematoblasti ed i leucociti, riguardo ai movimenti, non esiste; perchè nel sangue embrionale dei pesci ho veduto che gli ematoblasti eseguiscono gli stessi movimenti dei leucociti; temo che studiando il sangue nei vasi col metodo di Cohnheim abbia confuso cogli ematoblasti dei corpuscoli rossi scolorati durante la stasi venosa; ma è pur sempre vero, che Hayem portò un largo contributo di conoscenze alla storia del sangue e le descrizioni che ho fatto nelle pagine precedenti dei giovani corpuscoli rossi, corrispondono in molti punti a quanto Hayem aveva già pubblicato per il sangue della rana fino dal 1879.

« Ma Hayem non si occupò dell'origine vera dei giovani corpuscoli: fu Bizzozero che diede queste ricerche alla scienza colla serie memorabile delle sue ricerche. Nella Memoria che Bizzozero e Torre hanno presentato a questa Accademia nel 1883, sulla *produzione dei globuli rossi*, dimostrarono fra l'altre cose che:

« Nei vertebrati inferiori (rettili, anfibi e pesci) il sangue circolante
« presenta quella particolarità che allo stato embrionale si osserva nel sangue
« di tutti i vertebrati, contiene cioè in maggiore o minor numero dei globuli
« rossi giovani, e delle forme in scissione indiretta.

« Ho confermato pienamente le osservazioni di Bizzozero e Torre anche nei pesci.

« Nella tecnica fisiologica manca fino ad ora un metodo, che metta in evidenza le figure cariocinetiche senza alterare profondamente la struttura

dei corpuscoli sanguigni, e togliere ad essi l'emoglobina, o renderli colla coagulazione prodotta dai reagenti così diversi dal loro stato normale, che non sono più riconoscibili. Ritornerò in seguito su questo argomento; per ora mi limito ad esporre le osservazioni che ho fatto coll'acido osmico 1 per cento sul sangue di questo *Scyllium catulus*.

« In ogni preparato si trovano degli elementi giovani in scissione, forse 2 o 3 per cento corpuscoli adulti. Sono cellule omogenee formate da un grande nucleo della lunghezza di 14 μ a 17 μ: nel primo stadio della scissione presentano la forma di un rene, o di un fagiolo; vi è una infossatura che in altre cellule prende l'aspetto di una linea che divide il nucleo in due: e ciascuna metà conserva un nucleolo ed è rivestita della sostanza corticale che si accumula alle estremità opposte.

« La caratteristica di questi corpuscoli è, che il processo di scissione appare solo nel nucleo e non alla superficie della cellula, la quale conserva la sua forma elissoidea. Si vedono tutti i passaggi della scissione endogena: fino all'ultime forme, che constano di elementi rivestiti da uno strato leggermente granuloso, che ricopre come un velo sottile due nuclei staccati l'uno dall'altro e lontani da 1 μ a 2 μ. Questi nuclei sono ovali; misurano da 8 μ a 9 μ in lunghezza, da 5 μ a 7 μ in larghezza. Altre volte si vedono però delle cellule eguali per struttura che hanno dentro invece di due, tre divisioni, e in alcuni sembra che non si tratti di una vera scissione, ma di protuberanze del nucleo per cui assumono l'aspetto di masse isolate, o congiunte appena per un piccolo tratto in qualche punto. Tali forme si allontanano molto dal tipo della scissione per cariocinesi.

« Lo studio di questi elementi è importante, perchè nella fisiologia del sangue non è ancora deciso, se l'opera della riproduzione dei corpuscoli rossi si compia nel sangue che circola nei vasi; come pure non sappiamo se vi è un solo, o due modi di generazione dei corpuscoli; se cioè la riproduzione sia unicamente affidata alle cellule adulte, o se dovendo queste compiere l'ufficio della respirazione e della nutrizione dei tessuti, divengano incapaci alle funzioni riproduttive, e siano i giovani corpuscoli che si moltiplichino.

« Malassez nella sua importante Memoria: *Sur l'origine et la formation des globules rouges dans la moëlle des os* (1) ha già posto chiaramente tale questione: e i fatti da lui osservati sono degni di fiducia per la critica che fece dei metodi della tecnica, e l'uso dell'acido osmico da lui raccomandato. Un'altra ipotesi è che gli elementi in scissione così abbondanti nel sangue embrionale siano delle forme in necrobiosi, e dei corpuscoli giovani che muojono prima di aver raggiunto il loro sviluppo. Nelle prossime Note cercherò di risolvere questo problema ».

(1) Laboratoire d'histologie du Collège de France. Travaux de l'année 1882.
(2) Rend. della R. Acc. dei Lincei, 4 marzo 1888.

Fisiologia. — *Un veleno che si trova nel sangue dei murenidi.* Nota XIII del Socio A. Mosso.

§ I.

« Fra i pesci della famiglia dei murenidi ho studiato solo il genere *Anguilla, Muraena* e *Conger*. Non ebbi occasione di sperimentare su generi esotici, benchè questi siano molto numerosi.

« Il siero del sangue delle anguille, delle murene e dei congri ha un gusto differente da quello del siero degli altri pesci; quando se ne mette una goccia sulla lingua si sente un gusto leggermente salato, poi vi è un momento in cui si ha la percezione confusa di un sapore alcalino, e dopo 10 a 30 secondi (raramente dopo uno, o due minuti) si ha un' impressione di bruciore, ed un gusto acre, come di fosforo e di bile. Non conosco altra sostanza

nella quale esista un ritardo così lungo fra il momento nel quale si mette sulla lingua e quello in cui se ne percepisce il sapore. Se in vece di una goccia se ne mettono parecchie in bocca, si ha una sensazione molestissima ed irritante che dura lungo tempo; e anche sciacquandosi la bocca viene dopo un leggero stringimento alle fauci, seguito da abbondante secrezione della saliva: e si è molestati per lungo tempo dalla sensazione confusa di un sapore astringente. Forse non si tratta qui di un'azione gustativa, ma di una irritazione locale, come si vedrà meglio in seguito parlando delle iniezioni sottocutanee.

« Il colore del siero dei pesci può variare secondo le famiglie ed i generi. Le murene, le anguille ed i congri hanno il siero fluorescente; cioè guardandolo per trasparenza è giallognolo, come birra chiara, od orina, e a luce riflessa è di color bianco azzurrognolo, con dei riflessi simili al petrolio, o alle soluzioni di chinino.

« Questo però non ha che fare colla azione velenosa, perchè bollendo il siero dei murenidi conserva il medesimo colore fluorescente e perde l'azione tossica. Tra i pesci ed i rettili ne ho trovati molti (p. e. la *Solea* e la *Vipera*) che hanno il siero identico pel colore e per la fluorescenza al siero della murena e dell'anguilla, ma senza il gusto caratteristico, e senza l'azione velenosa. Il siero del *Conger myrus* e del *Conger vulgaris* ha un sapore meno bruciante ed è anche meno velenoso di quello della murena e dell'anguilla. Il sangue me lo procuravo tagliando colle forbici la coda e raccogliendo in un tubo di vetro le goccie che uscivano più o meno abbondanti (1). La coagulazione del sangue di questi pesci succede abbastanza rapida per avere in alcune ore parecchi centim. cubici di siero trasparente e privo di corpuscoli. Per essere sicuro che l'azione velenosa non dipendeva dalla putrefazione, adoperavo il siero freschissimo, o lo conservavo nel ghiaccio. Per utilizzare meglio il sangue dei murenidi, quando non era necessario di conoscere con scrupolosa esattezza la quantità del siero impiegato, preferivo mescolare il sangue estratto dall'animale con due volumi di Na Cl 0,75 °/₀ e colla macchina centrifuga facevo precipitare rapidamente i corpuscoli in modo da avere in meno di un'ora un liquido limpido e trasparente.

« Del resto non osservai alcuna differenza fra il sangue freschissimo, e quello dei murenidi morti da poco. Così che le anguille fresche che si

(1) I murenidi hanno poco sangue in confronto di altri pesci (per esempio i selaci ed i percidi) per alcuni dei quali ho determinato il rapporto fra il peso del corpo e quello del sangue. Da un'anguilla viva che pesava 1800 gr. al principio di marzo estraggo 32 cc. di sangue cioè circa $^1/_{54}$ del peso del corpo. Una murena presa in febbraio nell'acquario della Stazione zoologica di Napoli che pesava 1180 gr. dà 12 cc. di sangue, cioè circa $^1/_{90}$ del peso totale. I congri mi diedero anche meno sangue delle anguille e delle murene. Ma le differenze tra i vari individui sono così grandi, e il metodo così fallace, che si dovrebbero estendere molto queste misure per ottenere qualche risultato attendibile.

vendono sul mercato, sono egualmente buone per questi studi: solo che il siero è un poco rosso; ma la piccola quantità di emoglobina sciolta non influisce, tanto è micidiale l'azione del siero.

« L'esperienze sul sangue delle murene e dei congri le feci in parte alla Stazione zoologica di Napoli e in parte a Torino. Nell'inverno è facile aver del sangue fresco dalla Stazione zoologica di Napoli; e in poco più di 24 ore dopo estratto il sangue dai pesci marini, potevo fare a Torino le esperienze senza che esso presentasse alterazioni visibili.

« Il sangue ed il siero puro, od allungato con la soluzione di cloruro sodico, venivano sempre centrifugati, e non li adoperavo se non erano trasparenti, per eliminare il dubbio che i corpuscoli del sangue dei pesci venissero a complicare i risultati delle esperienze.

« Per evitare inutili ripetizioni chiamerò col nome di veleno dei murenidi, od *ittiotossico* « il veleno del siero del sangue dell'anguilla, della murena e dei congri ».

« Riferisco prima alcune esperienze per dare un'idea sommaria dell'azione di questo veleno, e dopo esaminerò con maggiori particolari gli effetti che produce nei vari organi.

Esperienza I. — Azione del siero di anguilla sul cane.

7 maggio 1888.

« Cane normale del peso di 15200 gr. Frequenza del respiro 16 in 60″. Polso 120 in 60″.

Ore 5.16. Iniezione di 0,5 cc. di siero fresco di anguilla nella vena giugulare.

« Appena finita l'iniezione, l'animale si agita molto. Slegato subito e messo in terra si regge male sulle gambe. Respirazione affannosa. Emette le orine.

Ore 5.18 cade e non si rialza più. Polso 90 in 60″. Pupilla dilatata. Sussulti. Accesso di convulsioni. Estremità rigide. Opistotono. Perdita delle feci. Le convulsioni durano circa 15″. Quando cessano l'animale non respira più. Le estremità posteriori sono insensibili: anche le pressioni fortissime non destano più alcun movimento riflesso.

Ore 5.20. L'animale fa qualche movimento respiratorio colla bocca: il polso nelle arterie è scomparso; mettendo l'orecchio sul torace non si sente più battere il cuore. Toccando la cornea le palpebre si muovono.

Ore 5.21. Manca ogni riflesso nell'occhio. Compare un tremito fibrillare nei muscoli delle estremità.

Ore 5.23. Anche questo tremito è cessato.

« Si leva il sangue dal cuore introducendo un tubo di vetro dentro la giugulare: questo sangue non coagula. Il siero che si separa dai corpuscoli rossi è trasparente. Al mattino successivo trovo che vi sono due strati: l'uno liquido, trasparente, e l'altro inferiore dei corpuscoli rossi che sono mobili senza coagulo.

« *Autossia.* — Non si vede alcuna lesione. Cuore in diastole, non più eccitabile per le azioni meccaniche. Manca ogni traccia di coagulazione del sangue nel cuore. Polmoni normali. Intestina alquanto congeste.

« Vedremo in seguito che anche dosi di solo 0,02 c.c. per chilogramma bastano per produrre la morte nei cani. In base a questa ed altre esperienze analoghe si può ritenere come probabile che un' anguilla del peso di due

chilogrammi sarebbe capace di uccidere per lo meno dieci uomini, quando potesse servirsi di tutto il siero del suo corpo, come fa la vipera del suo veleno.

« Trattandosi di un'azione tossica del siero il primo sospetto che viene, è che si tratti di un fermento il quale faccia coagulare il sangue. Ma non è così: anzi è precisamente il contrario, perchè ho visto in tutti gli animali, senza alcuna eccezione, che per effetto di questo veleno il sangue non coagula. E non si altera e non si scioglie, perchè trovai spesso, come in questo caso, il siero trasparente, ed il sangue incoagulabile.

« Pubblicherò in seguito un'altra Nota per dimostrare che l'azione dell'ittiotossico rassomiglia molto al veleno della vipera. Accenno preliminarmente questa affinità dei due veleni per facilitare l'interpretazione dei fatti.

« Le esperienze che ho fatto si possono dividere in due gruppi: in uno, che comprende il maggior numero di esperienze, gli animali morirono con forti convulsioni: nell'altro le convulsioni furono deboli e talvolta mancarono.

Esperienza II. — Azione del siero di anguilla nel cane.

7 maggio 1888.

« Un cane del peso di 4620 grammi viene preparato per scrivere la pressione del sangue nella carotide con un manometro a mercurio, il respiro si scrive con un pneumografo di Marey legato intorno al torace.

« Ore 3.42. Si inietta un centimetro cubico di siero d'anguilla. La respirazione diviene più frequente e più forte, l'animale si agita, e subito succede un accesso di forti convulsioni. La pressione del sangue cresce rapidamente e misura 150 millimetri. Dopo si abbassa e il cuore si arresta. Il torace è fermo in una inspirazione massima. L'animale muore in tetano alle ore 3.43. Cioè un minuto dopo l'amministrazione del veleno.

« Dopo che sono cessati i movimenti del cuore e del respiro vedo che le gambe slegate fanno dei leggeri movimenti. Scopro i muscoli e trovo che sono agitati da un tremito fibrillare, e che i tendini sono tirati con scosse irregolari. Taglio il nervo sciatico ed il nervo crurale e questi movimenti persistono ancora per qualche minuto, il che prova che non dipendono da eccitamenti che partissero dal midollo, ma che sono un fatto locale.

« *Autossia* fatta alle ore 4.11. — Non mostra nulla di notevole. Il cuore sembra rigido e contratto. Nei grossi vasi non vi sono coaguli e così pure nel cuore. Il sangue preso dai grossi vasi venne messo in due cilindri; in uno alle 4.35 era coagulato, nell'altro alle ore 5 è ancora liquido. Nel sangue che è coagulato non si separò il siero; il sangue rimase gelatinoso, e il coagulo così poco denso che versandolo in un altro cilindro si disfà tutto. Dopo 24 ore il sangue dell'altro cilindro non è ancora coagulato.

Esperienza III. — Azione del siero di murena sul cane.

25 maggio 1888.

« Ad un cane del peso di 6160 gr. amministro 0,66 centim. cub. di siero di murena, sciolto con 2 volumi di Na Cl 0,75 per cento. Appena finita l'iniezione l'animale si agita. Il respiro ed il polso sono frequenti. Messo in terra cade sul fianco, e non cerca di rialzarsi. Muove le gambe, ma non ha convulsioni tetaniche. Le estremità posteriori sono insensibili. Ritira le anteriori se vengono fortemente compresse. Pupilla dilatata. Il torace si arresta, poco

dopo cessa pure la respirazione diaframmatica. Il cuore batte così forte che si vedono sollevarsi le coste ad ogni sistole. Il cane estende le estremità con forza; probabilmente per effetto dell'asfissia.

« Dall'amministrazione del veleno alla morte sono trascorsi appena cinque minuti.

« *Autossia.* — Gli organi hanno aspetto normale. Si leva il sangue dal cuore e lo si trova fluido senza coaguli. Dopo 20 minuti non è coagulato, e nel cilindro in cui si è raccolto, i corpuscoli rossi si sono separati dal siero, il quale forma uno strato limpido e trasparente. Raccolgo questo siero con una pipetta, e lo metto in un cilindro nel ghiaccio. Dopo due ore esso non è ancora coagulato, e così pure il sangue. Il giorno dopo trovo che si formò nel siero un coagulo sottile come di fibre biancastre sparse nel liquido, che diventano più folte verso la parte inferiore del cilindro in contatto coi corpuscoli rossi. Nell'altro vaso il sangue è sciolto, e nel fondo vedesi un piccolo coagulo molle gelatinoso.

Esperienza IV. — Azione del siero di murena sul cane.

« Ad un cane del peso di 6760 grammi iniettiamo nella giugulare 0,4 centim. cubico di siero di murena. L'animale si agita, i battiti del cuore raddoppiano la loro frequenza. Il respiro è affannoso.

« Taglio i nervi vaghi da entrambi i lati. Il respiro non si rallenta e i battiti del cuore aumentano alquanto di numero. Faccio una seconda iniezione di 0,3 di siero di murena. Succede un nuovo aumento nella frequenza dei movimenti respiratori; la loro ampiezza è tripla del normale. È caratteristica in questo caso la debolezza e direi quasi la mancanza delle convulsioni, malgrado che le dosi del veleuo siano forti. Si arresta prima il torace, e poi il diaframma: il cuore batte ancora oltre un minuto.

« Il sangue nel cuore non è coagulato ed estratto non coagula.

Esperienza V. — Azione del siero di murena sul coniglio.

21 maggio 1888.

« Ad un coniglio del peso di 1030 gr. si amministra 0,3 cc. di siero del sangue di murena sciolto in 2 vol. di Na Cl 0,75 %. Dal momento che si fa l'iniezione del veleno nella giugulare a quello della morte completa passano 2′ 30″.

« I fenomeni osservati sono i seguenti: Finita la iniezione si vede che il respiro diventa più frequente. L'animale appena slegato cade su di un fianco ed è paralitico. Subito insorge un accesso di tetano, le estremità diventano rigide, le dite divaricate. La testa si piega lentamente sul dorso, e rimane fissa con forza nella massima estensione.

« Seguono rapidamente tre accessi di convulsioni tetaniche: quindi cessa il respiro. I muscoli tremano, l'occhio è protuberante. I vasi dell'orecchio contratti. Esce l'orina. Il cuore batte ancora. L'animale fa qualche movimento respiratorio colla bocca e col torace e muore; la pupilla è dilatata, le muccose della bocca livide. Le masse intestinali sono sconvolte da moti peristaltici così forti, che si vedono a traverso le pareti dell'addome.

« Dopo 4 minuti che il coniglio è morto è già comparsa la rigidità nelle gambe posteriori; manca nelle anteriori, nella mandibola, e nei muscoli del collo: dopo altri 20 minuti la rigidità è completa in tutti i muscoli.

« Il siero dei murenidi agisce in modo letale anche quando lo si inietta sotto la pelle, o nella cavità addominale.

Esperienza VI. — Azione del siero di anguilla sulla cavia.

14 aprile 1888.

« Ad una cavia del peso di 290 gr. si iniettano 2 cc. di siero d'anguilla nella cavità dell'addome servendosi di uno schizzetto di Pravaz.

« Sono le ore 3.44 pom. Si slega subito l'animale e non presenta nulla di notevole.

Ore 3.46. Comprimendo le dita delle zampe posteriori l'animale non reagisce. Si lascia mettere colle gambe larghe senza ritirarle.

Ore 3.49. Lo stato dell'animale peggiora rapidamente. Non si regge più sulle gambe; messo sul dorso rimane immobile. Respirazione affannosa da 70 a 72 movimenti respiratori in 30″. Ha un aspetto sonnolento.

Ore 3.54. La congiuntiva è ancora sensibile; in tutto il resto del corpo non è più possibile ottenere dei movimenti riflessi per mezzo della compressione.

Ore 4.12. L'animale malgrado tale apparente insensibilità è capace di muoversi; dopo essere rimasto sul dorso si volta da sè spontaneamente.

Ore 4.35. Respira a stento, apre largamente la bocca. Le labbra e il naso sono di colore violaceo.

« Continua per circa due minuti a fare delle respirazioni forzate, una ad ogni 10 secondi circa. Sono semplici inspirazioni facciali alle quali non corrisponde un moto visibile del torace e dell'addome.

« Ore 4.38. Anche la bocca cessa di spalancarsi, e il movimento respiratorio è limitato alle narici, poi tutto si ferma. Toccando l'occhio le palpebre non si muovono più.

« *Autossia.* — Cuore in diastole e fermo. Toccato collo scalpello il ventricolo sinistro fa qualche movimento debole. Le orecchiette pulsano spontaneamente. Le anse intestinali sono fortemente arrossate con macchie emorragiche. Si raccoglie circa 1 cc. e mezzo di un liquido sieroso rossastro in fondo alla cavità addominale, che però non ha il sapore del siero dell'anguilla. Malgrado questa infiammazione che si estende alle pareti dell'addome, l'animale non ha mai gridato o dato segno di dolore.

« In altri porcellini ai quali iniettai il siero d'anguilla sotto la pelle del dorso, gli effetti non furono così pronti, forse perchè l'assorbimento fu meno rapido che non per mezzo della cavità addominale. In questi casi osservai una azione irritante locale, e il tessuto sotto la pelle del dorso, dove si era fermato il veleno era infiammato: le masse intestinali non presentavano alcuna traccia di congestione.

Esperienza VII. — Azione del siero d'anguilla sulla cavia.

« Ad un altro porcellino del peso di 120 gr. al quale iniettai poco meno di 1 cc. di siero di anguilla nella cavità addominale alle 9,53, i fenomeni osservati sono alquanto differenti. Dopo 3 minuti l'animale ha già un aspetto sofferente, e poggia il muso sulla tavola, è sonnolento, socchiude gli occhi, tiene le gambe in una posizione anormale.

Ore 10. Toccato sembra svegliarsi; messo sul dorso riprende subito la posiziono di prima e ritorna a socchiudere gli occhi come se dormisse.

Ore 10.10. L'animale che aveva presentato prima delle contrazioni irregolari dei muscoli della faccia e dei muscoli masticatori e specialmente delle orecchie, per cui avvicinava il padiglione alla testa, ora presenta dei veri sussulti della testa o delle estremità come se rinculasse; ed emette contemporaneamente un gemito.

Ore 10,15. E più depresso: non si regge più sulle gambe; sta accosciato sul ventre.

Ore 11. Messo sul dorso cerca di rialzarsi, ma non riesce che a volgersi di fianco, e rimane in questa posizione. Il respiro è difficile. Spalanca la bocca. La sensibilità delle zampe non è ancora scomparsa. Alle 11,30 è morto.

« *Autossia.* Le anse intestinali, il grande epiploon, il peritoneo sono fortemente iniettati. Nella cavità dell'addome raccolgo 3 o 4 cc. di un liquido roseo che al microscopio trovasi contenere molti corpuscoli rossi del sangue di coniglio e pochi leucociti.

« Anche i piccioni muoiono, se si inietta loro uno o due centimetri cubici di siero di anguilla o di murena nell'addome. La morte si produce solo dopo parecchie ore; e nel punto dove fu iniettato il veleno si vede che ebbe una azione irritante.

« Nello studio delle dosi minime di siero dei murenidi, capaci di produrre la morte nei mammiferi, trovai che il quadro del veneficio si modifica notevolmente. Intorno a questo soggetto mi riserbo di fare ulteriori ricerche, intanto riferisco come saggio una esperienza fatta su di un coniglio.

Esperienza VIII. — Azione del veleno dell'anguilla sul coniglio.

11 maggio 1888.

Ore 9.10 antim. Un coniglio del peso di 1510, riceve 0,4 c.c. di siero di anguilla sciolti in 4 c.c. di Na Cl 0,75 % nella cavità addominale per mezzo di uno schizzetto di Pravaz.

Ore 9.30. L'animale tiene la testa in una forte estensione sul dorso: è intontito e come ipnotizzato: non si lascia spaventare, e non si muove minacciandolo. Pare che le estremità siano insensibili, perchè comprimendo le zampe posteriori non reagisce.

Ore 9.40. Spande l'orina.

Ore 9.45. Messo in terra si muove spontaneamente, ma cammina male.

Ore 9.55. Cade su di un fianco e non si rialza. Temperatura anale 37°,6. Le masse intestinali eseguiscono dei forti movimenti che si comunicano alle pareti addominali. Pupilla ristretta.

Ore 10.5. Di quando in quando alza il capo e tenta sollevarsi aiutandosi colle zampe anteriori, ma non può. Non muove mai le gambe posteriori. Finalmente riesce a voltarsi; e poggia sulla tavola l'addome e il torace colla testa sollevata indietro. Poi socchiude gli occhi e la testa si piega poco per volta all'innanzi fino a che viene a toccare la tavola col muso. Le gambe posteriori sono ancora sensibili, perchè eccitandole il coniglio si sveglia e reagisce.

Ore 11.5 è sempre nelle stesse condizioni.

Ore 12 è immobile e pare assopito; poggia la bocca sul pavimento tenendo la testa in mezzo alle gambe, e la parte posteriore del corpo è piegata di fianco colle gambe estese.

Ore 12.30. Ritorno al laboratorio e trovo che il coniglio è già morto e rigido: ma nessuno l'avrebbe creduto morto, guardando il suo atteggiamento. L'animale deve aver cambiato posizione dopo le 12 perchè ora l'addome e il torace poggiano sul pavimento colle gambe ripiegate sui lati e avvicinate al corpo. La testa poggia col muso ed è messa bene verticalmente colle orecchie diritte. Sollevo parecchie volte il coniglio ed è così rigido in tutti i suoi muscoli, che non si altera punto l'atteggiamento fisiologico col quale attraversò l'agonia e la morte senza scomporsi e muoversi.

« Le rane non sono immuni all'azione letale del siero dei murenidi.

Esperienza IX. — Azione del siero di anguilla sulla rana.

9 maggio 1888.

« Ad una rana esculenta si inietta 0,12 cc. di siero di anguilla sotto la pelle del dorso con uno schizzetto di Pravaz alle ore 3 p. Dopo due ore la rana è alquanto eccitata, perchè salta continuamente urtando col capo contro la campana, come se volesse fuggire. Ore 7,30. Sembra morta e si lascia mettere in tutti gli atteggiamenti; il cuore batte bene; per riflessione guardando le pareti del torace si contano 20 sistoli in 30″.

« I nervi sono poco eccitabili colle correnti indotte; solo adoperando degli eccitamenti che si possono dire forti per la lingua ottengo delle contrazioni nei muscoli della gamba, mettendo gli elettrodi sopra la pelle in corrispondenza del nervo sciatico. Taglio la pelle e scopro questo nervo: fra i muscoli vi è una vena che ledo inavvertentemente nel mettere gli elettrodi sotto il nervo. Immediatamente si spande molto sangue nella ferita, il che prova che la circolazione è ancora abbastanza attiva. L'eccitabilità del nervo sciatico scoperto è molto diminuita in confronto dello stato normale. Per ottenere una contrazione dei muscoli della gamba, bisogna impiegare una corrente indotta che si sente bene distinta sulla punta della lingua. Faccio il confronto con una rana uccisa di fresco: e trovo che la diminuzione della eccitabilità è grandissima da 26 a 16 cent. sulla scala arbitraria del mio apparecchio a slitta.

« Alle 10,30 è già comparsa la rigidità; nella rana che uccisi alle ore 7 non vi è traccia di rigidità. I muscoli sono così rigidi che non si piegano tenendo le gambe per l'estremità delle dita in modo che sorreggano tutto il peso del corpo. Le correnti massime che da un rocchetto ad induzione, sono affatto inattive sui muscoli delle zampe posteriori, sul midollo, sullo sciatico, mentre che invece portando questo eccitamento sopra i muscoli della nuca e delle estremità anteriori, questi si contraggono ancora. I muscoli dell'addome sono pure eccitabili.

« Nel mattino successivo la rana avvelenata è ancora rigida, mentre che due rane uccise ieri sera alle 7 pom. non sono ancora irrigidite: e quantunque si fosse distrutto il midollo in entrambe, i muscoli ed il nervo sciatico sono eccitabili tanto, che una corrente che non sento sopra la lingua applicata sul nervo sciatico produce delle forti contrazioni dei muscoli.

§ II.

Proprietà generali dell'ittiotossico.

« Alcune esperienze che feci per determinare la natura del veleno dei murenidi sono tanto elementari che basta enunciarne i risultati.

« I. Il siero dell'anguilla e della murena, perdono il gusto acre e bruciante se viene riscaldato a 100°.

« II. Il siero dell'anguilla e della murena dopo che venne riscaldato a 100° non è più velenoso.

« III. Il siero dell'anguilla e della murena essicato colla macchina pneumatica e ridisciolto conserva il suo gusto e la sua azione tossica.

« IV. Il siero dell'anguilla e della murena non contiene sali della bile, nè sostanze coloranti biliari.

« V. La parte velenosa del siero dei murenidi non si scioglie nell'alcool a 90°.

« VI. Il siero della murena e dell'anguilla iniettato nell'intestino tenue con un schizzetto di Pravaz a traverso le pareti addominali produce la morte.

« VII. Introdotto nello stomaco è innocuo.

« VIII. Il succo gastrico, l'acido acetico e l'acido cloridrico distruggono la parte velenosa del siero dei murenidi.

« IX. La putrefazione nel siero dei murenidi si manifesta nello stesso tempo dopo la morte, che nel siero degli altri pesci.

« X. L'ittiotossico è probabilmente una sostanza albuminosa.

« Da questi primi saggi fatti per conoscere le proprietà dell'ittiotossico si può già conchiudere che ha qualche rassomiglianza col veleno dei serpenti. La differenza e le affinità nell'azione fisiologica si vedranno meglio nella seguente Nota ».

Fisiologia. — *Azione fisiologica del veleno che si trova nel sangue dei murenidi.* Nota XIV del Socio A. Mosso.

§ I.

Respirazione.

« Buon numero di esperienze le feci col metodo grafico, e scrissi il respiro addominale e toracico, la pressione del sangue, e il polso della carotide ecc. In questa comunicazione preliminare accennerò solo i risultati ottenuti, e pubblicherò poi nelle Memorie dell'Accademia le grafiche e completerò lo studio comparativo del veleno dei murenidi con quello della vipera.

« Il primo effetto che produce l'ittiotossico è un aumento della frequenza del respiro. Questo fatto è di origine centrale e non dipende dall'azione dei vaghi: ho provato a tagliare i due nervi vaghi appena compariva l'acceleramento del respiro, e non ottenni il rallentamento caratteristico che si osserva sempre dopo tale operazione. Ho già riferito in esteso una di queste esperienze nella Nota XIII, esperienza IV.

« Il fenomeno che nella morte per il veleno dei murenidi si può accertare più facilmente, è l'arresto del respiro. Prima cessano i movimenti respiratori del torace, poi quelli dell'addome, ed in ultimo compaiono e si rinforzano quelli della faccia, mentre il cuore batte ancora fortemente.

« La morte succede però in modo diverso secondo le dosi. Per dosi mortali medie, che sono di 0,02 a 0,03 per chilogrammo di cane si arresta prima il respiro e poi il cuore. Le dosi più forti possono arrestare contemporaneamente il respiro ed il cuore, e colle dosi massime l'animale muore

istantaneamente per un arresto del cuore, mentre il torace e l'addome e specialmente la bocca, continuano per qualche minuto a muoversi.

Esperienza I. — Siero di anguilla.

10 maggio 1888. Cane del peso di 4350 grammi.

« Ore 9,48. Si inietta nella vena giugulare 0,2 centim. cubico di siero di anguilla (1).

« Scrivo i movimenti respiratori col pneumografo di Marey legato intorno al torace, il polso del cuore lo scrivo coll'apparecchio di gomma elastica fatto col dito di guanto e la trasmissione ad aria ad un timpano registratore secondo il metodo di Marey.

« L'animale finita l'iniezione fa ancora cinque o sei movimenti respiratori normali; poi improvvisamente (senza che si modifichi il respiro od il polso) scoppia un accesso di convulsioni. L'animale si agita così forte per circa un minuto che non è possibile scrivere bene il tracciato.

« Alle 9,50 appena cessano le convulsioni, il polso è più lento, e la pressione del sangue diminuisce. In 30 secondi, prima si registravano 48 pulsazioni, ora ve ne sono 20. La pressione continua a scemare e l'altezza delle pulsazioni carotidee diminuisce in altezza. Il respiro diviene irregolare, poi il torace si dilata lentamente, e rimane fermo in posizione inspiratoria. Il cuore continua a battere con grande frequenza, 56 in 30 secondi. Scrivo per quasi un minuto il polso della carotide, mentre il respiro è cessato completamente.

« Alle 9,52 si contraggono fortemente le estremità. Sembrano contrazioni dovute all'asfissia, ma non ne sono sicuro, perchè si ripetono due accessi a breve intervallo e nel primo il cane muove le gambe ripetutamente come se nuotasse. Durante questi accessi vi è perdita delle feci e dell'orina.

« Si fa la respirazione artificiale col soffietto; il cuore batte bene; esistono ancora i riflessi patellari, e manca ogni altro movimento riflesso; la pupilla è dilatata. Il polso diventa più debole e frequentissimo, poi cessa. L'animale muore.

« Si vede da questa esperienza che per la dose di 0,046 per chilogrammo di cane, non basta più la respirazione artificiale per salvare la vita.

« Riferisco un esperimento nel quale si amministrò la dose di 0,028 gr. di siero per chilogrammo. In questa esperienza la respirazione artificiale diede tempo al centro respiratorio di rimettersi : e riprendendo questo le sue funzioni comparve il fenomeno della respirazione periodica, o remittente. Ripetendo dopo un certo tempo la stessa dose l'animale soccombe malgrado la respirazione artificiale.

Esperienza II. — Siero di anguilla.

11 maggio 1888. Cane del peso di 12000 grammi.

« Si prepara la trachea, la vena e la carotide e si scrive il tracciato normale della respirazione toracica e del polso come nella esperienza precedente.

« Alle ore 3,10 pom. si inietta 0,25 centim. cubico siero di anguilla.

(1) Per dosare meglio le piccole quantità di siero adopero una soluzione che contiene $^1/_4$ siero e $^3/_4$ Na Cl 0,75 %. Dopo la prima iniezione del siero nella giugulare faccio l'iniezione nella vena, un'altra iniezione di un centim. cubico di cloruro sodico 0,75 % per pulire la cannula.

« L'altezza delle pulsazioni diminuisce, ma non diminuisce la pressione. Il respiro è più frequente. A un certo punto il cuore rallenta i suoi battiti ed il respiro continua colla medesima frequenza. Subito dopo succede un accesso di convulsioni che dura pochissimo; quando cessa, la pressione diminuisce. Il polso diventa più piccolo ed il respiro irregolare e superficiale; quindi si arresta. Aspetto un minuto e vedendo che nè il torace, nè l'addome si muovono, faccio eseguire la respirazione col soffietto. Si continua per due minuti circa senza che l'animale faccia spontaneamente qualche moto respiratorio. Faccio cessare la respirazione artificiale per vedere se l'asfissia incipiente possa destare la funzione del respiro, resa inerte forse dall'apnea. Infatti succede una pausa di quasi un minuto, e dopo il cane fa un moto inspiratorio profondo. Lo aiuto ancora per qualche minuto colla respirazione artificiale, finchè comparisce la respirazione spontanea e continua da sè.

« La frequenza del respiro è la metà minore di quanto era nello stato normale, e ha dei periodi che corrispondono al tipo di Cheyne e Stokes che ho chiamato respirazione remittente (1) cioè non esiste un'interruzione, ma ad ogni 9 o 12 o 15 movimenti respiratori ne succede uno più profondo e subito dopo questo gli altri movimenti diventano più superficiali, e dopo si fa una scala di inspirazioni successivamente crescenti fino a che se ne produce una massima.

Ore 3,31 ripeto l'iniezione di 0,25 cent. cubico del siero di anguilla. Succede subito un accesso di contrazioni tetaniche e il cuore si arresta; succedono altre contrazioni deboli, mentre il respiro addominale è abbastanza forte. Appena vediamo che il respiro si ferma, facciamo subito col soffietto la respirazione artificiale, ma senza alcun risultato. L'animale muore alle 3,34, cioè tre minuti dopo l'iniezione della seconda dose di veleno.

« Nel momento che cessa il respiro e mentre si faceva ancora la respirazione col soffietto scoprii il plesso bracchiale, ed i nervi che vanno al torace, eccitandoli con una corrente indotta dell'apparecchio a slitta, la quale appena si sentiva sulla lingua, trovai che i nervi erano bene eccitabili. Questo dimostra che l'arresto del respiro dipende da un disturbo della funzione del centro respiratorio e non da una paralisi dei nervi periferici.

« L'arresto del respiro è il fatto più caratteristico e il punto dove appare meglio evidente la rassomiglianza dell'ittiotossico col veleno dei serpenti. Non cito gli autori antichi perchè le loro idee sulle funzioni dell'organismo erano troppo diverse dalle nostre e perchè l'analisi fisiologica si fa ora con altro indirizzo.

« Uno dei lavori più importanti è quello che Lauder Brunton pubblicò con I. Fayrer, *Sul veleno dei serpenti dell'India* (2). Quivi è detto che l'azione sui movimenti respiratori è la più importante, e che la morte per il morso dei serpenti è dovuta all'arresto del respiro per la paralisi del midollo spinale, e in parte per la paralisi dei nervi motori che si distribuiscono ai muscoli respiratori.

« Quando mi accorsi dell'affinità che l'ittiotossico aveva col veleno dei serpenti ho voluto farne il paragone con quello della vipera. Sapendo dalla

(1) A Mosso, *La respirazione periodica e la respirazione di lusso.* Memorie della R. Accademia dei Lincei, 1886.

(2) Proceedings of the Royal Society. Vol. XXII, p. 118, 1874.

pubblicazione fatta dal prof. Romiti che a Siena vi sono delle vipere così grosse che una sola ha potuto uccidere un uomo mordendolo [1] pregai il sig. Brogi di mandarmi le *vipere aspis* più grosse che egli potesse trovare nei dintorni di Siena. Tagliai la testa a due di queste vipere e scoperte le ghiandole feci uscire dal loro interno con leggera pressione alcune gocce di veleno di colore giallognolo e di reazione acida, che dai denti feci cadere in un vetro da orologio. Ne pesai 0,0561 grammi, lo sciolsi in 1 cc. di cloruro sodico 0,75 per cento e feci la seguente esperienza.

Esperienza III. — Azione del veleno della vipera.

22 maggio 1888.

« Cane normale del peso di 7300 grammi. Scrivo il respiro col pneumografo di Marey messo intorno al torace, e il polso del cuore col dito di gomma elastica e la trasmissione ad aria secondo il metodo Marey. Fatta una linea di tracciato normale alle ore 1.40 pom. inietto nella giugulare il veleno della vipera. Succede immediatamente un aumento nella frequenza e nella forza dei movimenti respiratori, il cuore invece rallenta e rinvigorisce i suoi battiti. Dopo 15″ che si è fatta l'iniezione il torace e l'addome sono completamente immobili. Le estremità dell'animale sono rigide. Il torace si dilata lentamente. Il tracciato scritto dal pneumografo segna una linea che si solleva gradatamente, nella quale si vede un tremito rapidissimo dei muscoli toracici. Questa linea si solleva lentamente per un minuto e mezzo circa, finchè il torace si ferma nella sua massima dilatazione.

« Il cuore in questo frattempo batte con una frequenza minore del normale, cioè di 8 pulsazioni in 10″ e le sistoli sono forti. Però circa 1 minuto e mezzo dopo che il respiro è cessato, i battiti cardiaci cominciano a diventare più piccoli e più frequenti del normale. A questo punto faccio eseguire la respirazione artificiale comprimendo il torace colle mani e scopro la trachea per fare il respiro col soffietto.

« All'1.45 incomincia regolarmente la respirazione artificiale: continua per un minuto, ma il cuore non si rinforza. Sospendo il respiro per 30″, e non vi è alcun segno che l'animale tenda a respirare spontaneo. Si continua il respiro artificiale per 10 minuti fino all'1.55. Il cuore batte regolarmente da 39 a 40 pulsazioni in 10 secondi. I vasi sanguigni sono immobili perchè la linea del tracciato del polso carotideo si mantiene diritta ed orizzontale; anche sospendendo il respiro per 30 secondi la pressione non cambia, il che dimostra che vi è una paralisi, od una insensibilità profonda dei vasi.

« All'1.57 sospendo la respirazione artificiale per 50 secondi: la pressione del sangue aumenta pochissimo e solo in fine si manifesta la tendenza ad aumentare. Le sistoli del cuore non modificano la loro frequenza. Vedendo che il cane è divenuto così profondamente insensibile, eccito le estremità posteriori con delle correnti indotte fortissime, e guardo la pupilla che è mediocremente dilatata, ma essa non reagisce. Ripeto l'esperienza sull'altra gamba, e pure senza effetto. Faccio eseguire l'eccitamento nella regione dell'ano, e l'animale è insensibile. Anche la cornea non è più eccitabile.

« Essendomi persuaso che per il veleno della vipera è scomparsa ogni traccia di sensibilità, faccio continuare per un'ora la respirazione artificiale.

« Alle ore 2.40 il cane respira da sè. I movimenti sono poco profondi, ma regolari da 8 a 9 in 30″. Il polso è piccolo e frequente, 30 pulsazioni in 10″.

« Quantunque l'animale sia slegato non fece mai il più piccolo movimento. Alle

[1] Romiti, Archives italiennes de biologie. Tome V, 1884, p. 37.

ore 3.3 succede una contrazione forte dei muscoli estensorî delle gambe e cessa il respiro. Le sistoli cardiache cambiano pure di forma e di frequenza: diventano più forti e più lente; da 8 a 9 in 10″. Dopo circa 20″ comparisce un movimento inspiratorio spontaneo e profondo. Aspetto ancora 20 secondi, e poi vedendo che il respiro non compare ricomincio la respirazione artificiale col soffietto. Il polso torna a diventare frequente, ciò che dimostra che il precedente ritardo che si produsse durante e dopo le convulsioni era forse dovuto ad una eccitazione dei centri nervosi all'origine del vago.

« Alle ore 3.12 si sospende il respiro artificiale, ma senza effetto sul cuore e sul centro respiratorio che è di nuovo paralizzato.

« Alle ore 3.13 si prende la temperatura nel retto = 36°,2. Sospendendo il respiro si vede qualche leggero movimento del diaframma trasmesso all'addome, il torace e tutto il corpo è immobile. Eccito il nervo crurale con una corrente indotta, succede una contrazione forte dei muscoli corrispondenti, ma l'animale non dà alcun segno di sentire il dolore e la pressione del sangue non varia. Mancano sempre i riflessi delle palpebre quando si tocca la cornea.

« Si continua colla respirazione artificiale. Alle 3.26 si sospende e vedesi che l'animale muove spontaneamente l'addome. I movimenti del diaframma si ripetono colla frequenza di 6 al minuto, e rassomigliano come ad un colpo di singhiozzo, tanto è rapida la contrazione del diaframma. La frequenza del polso è 60 in 30″.

« Alle 3.45 succede un altro accesso leggero di contrazioni. L'animale estende lentamente, ma con forza le estremità; i muscoli tremano, e il respiro cessa, il cuore si rallenta. Non aiuto più l'animale col respiro artificiale ed esso muore senza altre convulsioni.

« Ore 3,50. Levo il sangue dalla giugulare con un tubo di vetro piegato ad angolo retto che entra fino al cuore, e raccolgo il sangue in un cilindro. Questo sangue non coagula. Il giorno successivo è ancora perfettamente liquido: il siero è rosso.

« *Autossia.* Nel cuore e nei grossi vasi non vi sono coaguli. Del resto nulla di notevole: solo i polmoni sono un po' ingorgati e un po' meno crepitanti del normale.

« Ho riferito questa esperienza alquanto in esteso perchè essa ci dà un'idea esatta del meccanismo di azione del veleno della vipera, e dimostra l'utilità della respirazione artificiale; ma più che tutto perchè ci permette di paragonare nei loro effetti mortali le dosi del siero di anguilla col veleno della vipera. Vediamo cioè che il cane dell'esperienza II, il quale pesava 12000 gr., è morto per una dose di veleno di siero di anguilla eguale a 0,0208 per chilogramma, mentre questo che pesava 7300 gr. è morto un po' meno rapidamente per una dose di 0,0077 gr. di veleno della vipera per chilogramma. Si può dunque dire che per i cani *il veleno della vipera è circa tre volte più velenoso del siero di anguilla.*

§ II.

Cuore e vasi sanguigni.

« Il siero dei murenidi ha poca azione sul cuore delle rane. Se si mettono in due vetri da orologio due cuori di rana, e ad uno si aggiunge semplicemente qualche goccia di cloruro sodico al 0,75 per cento, e all'altro qualche goccia di siero d'anguilla, non è apprezzabile la differenza colla quale in entrambi si spegne poco per volta il moto.

« Sul cuore scoperto di una rana, ho messo una goccia del siero di murena, e non vidi alcun effetto.

« Non ho fatto esperienze colla circolazione artificiale in modo che il veleno agisse dalla superficie interna del cuore. Forse queste esperienze daranno risultati più evidenti; ma già si vede che l'ittiotossico non esercita una azione efficace sul cuore.

« Questo stabilisce un altro punto di rassomiglianza fra il veleno dei murenidi e quello dei serpenti (1). Però nelle rane che avvelenavo coll'ittiotossico il cuore cessava di battere assai prima che in quelle alle quali distruggevo il midollo. Forse le esperienze che si fanno estirpando o scoprendo il cuore durano poco, e il cuore si altera per altre cause prima che l'azione locale del veleno possa rendersi evidente (2).

« Cercando se il siero dei murenidi era velenoso per i pesci, ho visto che le motelle morivano coll'iniezione di un centimetro cubico di siero di murena nella cavità addominale, e in un caso tre ore dopo l'iniezione il cuore era fermo. Continuerò queste indagini: intanto esaminiamo cosa succede nei mammiferi, dove è più facile l'analisi dei fenomeni nervosi del cuore.

« Nei cani il primo effetto dell'ittiotossico (come abbiamo già veduto nell'esperienza I e II) è una diminuzione di frequenza e un aumento nella forza dei battiti cardiaci, come se vi esistesse un'irritazione del vago; dopo i movimenti cardiaci diventano frequentissimi, come se il vago fosse paralizzato: ed è probabile che nel centro all'origine del vago vi sia prima un eccitamento e dopo una paralisi.

Esperienza IV. Siero di murena.

23 maggio 1888.

« Cane del peso di chilog. 21. Preparata la carotide e i nervi vaghi, prendo un pezzo di tracciato normale scrivendo il respiro col pneumografo di Marey intorno al torace, e il polso della carotide coll'apparecchio anzidetto di Marey. Quindi determino quale sia la corrente minima di un apparecchio Du Bois Reymond che applicata sui vaghi rallenta ed arresta i moti del cuore.

« Dalle ore 10,7 alle ore 10,9 si inietta lentamente nella giugulare centim. cub. 1,35 di siero di murena coll'aggiunta di due volumi eguali di Na Cl. 0.75 %.

(1) P. Panceri e F. Gasco (*Esperienze intorno agli effetti del veleno della naja egiziana e della ceraste.* Atti della R. Accademia delle scienze di Napoli, 1873, pag. 23) avevano già detto parlando del veleno della naja egiziana: « Una prova assoluta che questo non è un veleno del cuore sta nel fatto, che tenuto sommerso da noi il cuore in posto di un *axolotl* nel liquido velenoso, non cambiò punto il suo ritmo e continuò a pulsare lungamente con sistoli fatte ancor più energiche dal nuovo stimolo ».

(2) Panceri e Gasco, op. cit., pag. 24, fecero un'osservazione sul cuore dell'*axolotl*, la quale dimostra come il veleno della naja distrugga l'azione nervosa. L'*axolotl* essendo provvisto di branchie esterne ha l'apparecchio respiratorio disposto nel modo il più favorevole per dare tempo all'animale di rimettersi e di eliminare il veleno quando il cuore continui a battere, ma cionullameno esso muore.

« Quando il respiro è divenuto irregolare e superficiale, 27 in 10 secondi, e i movimenti cardiaci deboli, 16 in 10 secondi, irrito meccanicamente i vaghi, tirando le anse del filo nei quali li ho messi; i moti del respiro diventano fortissimi e più lenti. Nei primi 10 secondi successivi alla irritazione contansi 10 respirazioni. I battiti del cuore si rallentano e si rinforzano. Cessato l'effetto dell'irritazione meccanica, il respiro diventa sempre meno ampio e più frequente. Dopo più di un minuto fa 33 respirazioni in 10 secondi, e tanto piccole che appena si vedono; il cuore batte rapidissimo. Un altro eccitamento meccanico del vago produce lo stesso effetto di prima, ma sono un po' meno profonde le inspirazioni: vi è una scala decrescente di respirazioni sempre più piccole fino a che il respiro si arresta. Preparo subito la trachea e faccio la respirazione dalle ore 10,18 alle 10,19.

« Sospendo il respiro col soffietto. Dopo 31 secondi fa un movimento inspiratorio. Il cuore batte lentissimo, fa 6 a 7 pulsazioni in 10 secondi. Continuo col respiro artificiale dalle 10,21 alle 10,22. Sospendo il respiro, il cane fa due movimenti uno dopo 19 secondi, l'altro dopo 25. In questo punto irrito i vaghi e succede un aumento della frequenza dei battiti cardiaci. Prima erano 4 in 10 secondi, durante l'irritazione diventano 14 in 10 secondi. Un fatto analogo venne già osservato dal prof. Albertoni nelle sue pregevoli ricerche intorno al veleno della vipera (1).

« Dopo 25 secondi che si è fatta l'irritazione del vago, il respiro ricomincia spontaneamente e continua colla frequenza di 6 in 30 secondi. Il cuore fa 8 a 9 pulsazioni in 10 secondi.

« Alle ore 10,27 si irritano i due vaghi, ma senza effetto: aumentiamo subito l'intensità dell'eccitamento, e si vede subito un effetto nel respiro che diventa più forte, nel cuore appare un leggero rallentamento dei battiti.

« Alle ore 10,36 il respiro continua spontaneo colla frequenza di 5 inspirazioni regolari e profonde ogni 30 secondi: il cuore nel medesimo tempo fa 40 pulsazioni.

« Ore 10,37. Si inietta lentamente 0,3 cent. cubici di siero di anguilla coll'aggiunta di due volumi eguali di Na Cl 0,75 per cento: il cuore si arresta, il respiro continua, ma diminuisce l'ampiezza dei movimenti.

« Si fa subito la respirazione artificiale e si continua per 10 minuti, ma senza effetto, perchè il cuore rimane fermo.

« La pupilla si dilata, e l'animale muore senza convulsioni.

« È questa la sola esperienza che io ho fatto dove appare evidente un'azione dell'ittiotossico sui nervi vaghi; non riferisco le altre che hanno dato dei risultati negativi.

« La morte del cuore è un fenomeno complesso, e l'aumento della frequenza non è prodotto dalla paralisi dei vaghi. Quando l'avvelenamento non è troppo grave, manca ogni alterazione nella conducibilità dei vaghi, e non solo la loro azione centrifuga, ma anche la centripeta è conservata, perchè i movimenti del cuore e del respiro eccitando il nervo vago si modificano entrambi. Ma nell'ultimo periodo dell'avvelenamento intenso si mani-

(1) P. Albertoni, *Sull'azione del veleno della vipera.* Sperimentale. Firenze 1879. Credo utile riferire le sue parole, perchè si veda meglio l'affinità del veleno dei murenidi con quello della vipera. « L'apparecchio nervoso d'arresto del cuore non perde la « propria attività per l'azione del veleno viperino, perocchè si ha l'arresto cardiaco per « l'eccitazione elettrica del vago. Vi è però uno stadio del veneficio, ed è quello, che pre- « cede immediatamente la morte, nel quale per l'irritazione elettrica del vago si ha un « acceleramento negli atti cardiaci in luogo che un rallentamento, od un arresto ».

festa un'azione locale dell'ittiotossico sul cuore. Quando i battiti del cuore sono divenuti molto lenti, ho veduto che tagliando i due vaghi non si aumentava la frequenza del polso: ma questo lo si vede qualche volta anche nell'agonia senza l'azione dei veleni.

Azione sui vasi sanguigni.

« Facendo delle esperienze col manometro a mercurio messo in comunicazione colla carotide, osservai dopo l'iniezione, un fortissimo aumento della pressione: come si vede nella Nota XIII, esperienza II.

« Questo fatto non può attribuirsi esclusivamente alla contrazione dei vasi sanguigni ed alla frequenza maggiore delle sistoli cardiache, perchè gli animali per effetto del veleno entrano in convulsione, se le dosi sono elevate, e la pressione del sangue supera i 120 mm. e tocca nei cani anche i 150 mm.

« Quando invece le dosi sono piccole e non producono convulsioni, l'aumento della pressione è minimo e fugace, e dopo tende a diminuire.

« Albertoni aveva già dimostrato (1) che per il veleno della vipera vi è uno stretto rapporto fra le modificazioni nella pressione sanguigna e la rapidità maggiore o minore dell'esito letale: io ho trovato la medesima relazione per il veleno dei murenidi, e vidi che la pressione del sangue diminuisce rapidamente, cessato il periodo delle convulsioni.

« Le piccole dosi non paralizzano i vasi sanguigni, e questo lo si vede non solo col manometro, ma anche semplicemente guardando i vasi nell'orecchio del coniglio, che continuano a dilatarsi e contrarsi a periodi irregolari.

§ III.

Azione sul sangue.

« Dirò estesamente in una prossima Nota come il sangue non coaguli più negli animali avvelenati coll'ittiotossico; e svolgerò meglio in tale circostanza il fatto accennato nella Nota IX che anche il verde metile produce tale effetto. Per ora mi basta di mettere in evidenza l'affinità di azione dell'ittiotossico, del veleno dei serpenti e delle vipere.

« Il sangue venoso degli animali uccisi col siero dei murenidi presenta un colore molto scuro: in quelli però dove si è fatta la respirazione artificiale fino a che si arrestò completamente il cuore, il sangue nel ventricolo sinistro è più rosso che nel destro. E così pure sbattendo il sangue venoso che si prende dalla giugulare nel cuore destro, si vede che ritorna rosso come il sangue normale.

(1) P. Albertoni, op. cit., pag. 9.

« Il fatto più interessante e quasi costante è che il sangue non coagula più.

« Riferisco qualche esempio. Ad un cane del peso di 4620 gr. ucciso il 7 maggio col siero dell'anguilla, prendo 100 cent. cubici del suo sangue dalla vena giugulare e li mantengo per due giorni nella ghiacciaia; dopo trovo che il sangue non è coagulato, ha il siero rosso, e nel sangue liquido sottostante versandolo si trova un coagulo molle come gelatina di ribes; messo questo coagulo in un cilindro graduato misura 3,5 centimetri cubici.

« Un altro cane del 7 maggio che pesava 15200 gr. ucciso col siero dell'anguilla, dopo 48 il sangue preso dalla giugulare e conservato nella ghiacciaia non è coagulato, il siero è rosso. Il sangue sottostante è fluido. Solo intorno alle pareti del cilindro vi è un coagulo sottile disteso come un velo roseo sul vetro.

« La coagulazione nel veneficio col siero dei murenidi quando succede, è incompleta, non vi è retrazione del coagulo, il siero non si separa dal cruore e si forma come una gelatina, la quale si spappola facilmente. In un solo caso trovai il sangue coagulato, e fu un coniglio avvelenato col siero di anguilla, ma temo sia successo, perchè ho preso il sangue dal cuore con una pipetta che terminava in un tubo capillare; se come nelle altre osservazioni avessi estratto il sangue dalla giugulare, od inciso il cuore mettendovi sotto un cilindro, forse si sarebbe verificato anche qui un ritardo più notevole della coagulazione.

« Fayrer nella sua grande opera intorno ai serpenti velenosi dell'India (1) dice che il sangue è fluido negli animali morti per il veleno dei serpenti viperini e coagulato negli animali che morirono per il veleno dei colubrini. Il sangue dell'uomo, Fayrer lo trovò fluido in tutti i casi di avvelenamento, tanto per i colubrini, quanto per i viperini. Nel 1873 Fayer nella prima parte del lavoro pubblicato con Lauder Brunton (2) dice che il sangue spesso non coagula negli animali morti per il veleno dei serpenti.

« Panceri e Gasco non rilevarono differenza fra il veleno di ceraste e quello di naja, il sangue in tutti gli animali era coagulato nei grossi vasi, o coagulabile non appena uscito dal corpo dell'animale di recente venuto a morte.

« Anche Wall trovò il sangue fluido nell'uomo e coagulato negli animali avvelenati col morso della *Naja tripudians:* fatta eccezione di alcuni casi (3). Quanto al sangue degli animali uccisi col veleno della *Daboja Russellii*, egli dice che non coagulò mai, eccettuati i casi nei quali la morte successe per convulsioni o dopo un lungo esaurimento (4).

« Albertoni afferma che il veleno della vipera injettato nelle vene rende

(1) I. Fayrer, *The Thanatophidia of India.* London, 1872, pag. 64.
(2) Proceedings of the Royal Society, vol. XXI, pag. 371, 1873; vol. XXII, 1874, p. 84.
(3) A. J. Wall, *Indian snake poisons their Nature and Effects.* London, 1883, p. 15, 42.
(4) Op. cit. pag. 76.

il sangue incoagulabile (1). Nelle esperienze che ho fatto e delle quali ho riferito un esempio nell'esperienza III di questo paragrafo, il sangue non coagulò. Sono appena sei casi; tre sui conigli, e tre sui cani, ma il risultato fu costante.

« Ho voluto dare questo rapido sguardo allo stato delle cognizioni d'oggi per dimostrare quanto è facile errare anche nelle cose le più semplici. Trattandosi di constatare, se il sangue negli animali morti per veleno dei serpenti sia liquido, o coagulato, parrebbe che non vi possa essere discussione: eppure Fontana che forse fu quegli che fece il maggior numero di esperienze sulle vipere, dopo aver trovato che il sangue mescolato fuori dell'organismo col veleno della vipera non coagula più, disse che « la coagulazione del « sangue è certamente l'effetto il più notevole del veleno della vipera, quello « che deve produrre i più gravi disordini nei visceri ». L'animale morso dalla vipera, muore unicamente, secondo Fontana, perchè il sangue si coagula, corrompe e distrugge gli organi (2).

« Malgrado l'autorità del Fontana, devo ammettere che il sangue negli animali uccisi col veleno della vipera perde la facoltà di coagularsi, e questo stabilisce una rassomiglianza col veleno dei murenidi, dove il sangue lo trovai sempre sciolto, o non coagulò che lentamente e male estraendolo dall'organismo.

§ IV.

Sistema nervoso.

« Le osservazioni precedenti fanno già intravedere quale sia l'azione dell'ittiotossico sul sistema nervoso.

« Nel quadro del veneficio prevale l'azione sul midollo spinale, sui centri motori, e sul centro respiratorio, ma anche i nervi non sono incolumi.

« Le esperienze fatte sulle rane dimostrano che il siero dell'anguilla paralizza i nervi, ed agisce pure sulla eccitabilità dei muscoli.

« Nell'esperienza IX della Nota XIII ho già detto come la diminuzione della eccitabilità dei nervi può divenire assai evidente nelle rane avvelenate col siero dell'anguilla, ora riferisco un'altra esperienza dove mentre il cuore batte ancora, non mi fu più possibile ottenere delle contrazioni nei muscoli della gamba eccitando il nervo sciatico.

Esperienza V. — Azione del siero di anguilla sulla rana.

8 maggio 1888.

« Ad una rana si inietta sotto la pelle del dorso 0,25 cc. di siero di anguilla alle ore 3 pom. Durante tre ore non si vede nulla di particolare, eccetto che una leggera depressione.

(1) Albertoni e Stefani, *Manuale di fisiologia*, 1888. Capitolo *sulla coagulazione del sangue*.

(2) F. Fontana, *Traité sur le vénin de la vipere*. Florence, 1781, pag. 318 e 327.

« Ore 8 pom. La rana è ingobbita: tocca col muso il piatto: è poco eccitabile: occhio depresso: pupilla stretta: è assopita e stupida come una rana che non avesse il cervello.

« Nel mattino successivo alle 8 trovo la rana rovesciata sul dorso che sembra morta. Non reagisce pizzicandola con una pinzetta. Il cuore batte così debolmente che per riflessione si vede appena dall'esterno. Sotto la pelle del dorso si è raccolto un liquido colore citrino, alcalino. Vi fu azione irritante locale perchè il tessuto sottocutaneo dorsale è come edamatoso. I cuori linfatici sono immobili. I muscoli dell'addome e delle estremità eccitati direttamente con una corrente indotta, che non può resistersi sulla lingua, si contraggono ancora: per far contrarre i muscoli delle estremità posteriori bisogna servirsi di un eccitamento molto più forte; cioè avvicinare i rocchetti da 9 centim. a 3 centim. Questa corrente indotta così forte non produce alcun effetto applicata nel nervo sciatico, dell'uno e dell'altro lato. Apro il torace e trovo che il cuore batte ancora.

« Questa esperienza insieme ad altre due analoghe dimostra che il siero dell'anguilla agisce intensamente sui nervi e sui muscoli, ma l'effetto non è costante, perchè in altre rane e col siero di altre anguille e delle murene non l'osservai più.

« Valentin ha già notato un fenomeno analogo nelle rane studiando il veleno della vipera; perchè egli disse (1) che spesso dopo 5 ore era scomparsa completamente l'eccitabilità dei muscoli, e dei nervi.

« Nei mammiferi vi sono due quadri diversi del veneficio: secondo che le convulsioni sono forti o deboli, ma tanto nell'un caso, quanto nell'altro, si vede che l'ittiotossico appartiene ai narcotici. Gli animali che non muoiono immediatamente divengono sonnolenti, insensibili, apatici. Qualche volta hanno degli accessi di vomito, spesso tremano. Sembra che i muscoli siano dolenti, o rigidi, perchè l'animale si muove con stento, o prende delle posizioni strane. La sensibilità della pelle, specialmente delle estremità posteriori, scompare molto presto.

« Il fatto più importante è che la sensibilità scompare prima della motilità, ciò che non sarebbe favorevole alla supposizione che il siero dei muremidi rassomigli per i suoi effetti al curaro. Per dare sommariamente un esempio di questo fatto dirò che un coniglio il quale dopo l'amministrazione dell'ittiotossico nella vena giugulare passeggiava per il laboratorio, e cambiava spontaneamente di posizione e di luogo, aveva le estremità posteriori tanto insensibili, che non solo comprimendole forte col piede non dava alcun segno di dolore, ma anche bruciandole fino all'osso con un grosso tubo di vetro arroventato e fuso, non dava alcun segno di dolore e non si moveva, nè reagiva.

« Se pensiamo che questo coniglio gridava fortemente appena si comprimeva, o si irritava le estremità anteriori, od il muso, e che i riflessi negli occhi erano completi, viene escluso il dubbio che si tratti di un'azione generale sui nervi sensibili. In tale caso dovrebbe essere generale la insensibilità; ma questo non l'ho veduto in nessuna esperienza.

(1) Op. cit. pag. 111.

« Questo fatto stabilirebbe un altro punto di rassomiglianza col veleno della vipera. Valentin nel suo interessante lavoro, *Sul veleno della vipera* (1) osservò che qualche volta le rane avvelenate reagiscono colle gambe posteriori se vengono eccitate le estremità anteriori, e non reagiscono punto se vengono eccitate le estremità posteriori.

« Probabilmente l'eccitabilità delle cellule nei centri nervosi, e la conducibilità del midollo verso il cervello sono lese profondamente. Io non so spiegarmi in altro modo questa insensibilità delle gambe posteriori, mentre che tutte le altre parti meno lontane dal cervello continuano ad essere sensibili.

« La conducibilità dei nervi sensibili deve essere abolita per le estremità posteriori, perchè anche guardando la pupilla e scrivendo la pressione del sangue, non ho più veduto alcuna variazione per gli eccitamenti i più forti colla pressione meccanica e colle correnti elettriche indotte applicate sulle estremità posteriori. Nei medesimi animali degli eccitamenti molto più deboli applicati alle estremità anteriori, o sulla faccia, producevano una forte reazione locale e anche dei movimenti riflessi delle estremità posteriori.

« Si può supporre che nelle estremità posteriori le vie nervose del moto siano meno lese, oppure che gli eccitamenti che partono dai centri per muovere i muscoli delle estremità posteriori, abbiano una intensità maggiore, o che possano propagarsi più facilmente nei nervi di moto, che non gli stimoli che noi applichiamo sui nervi sensibili.

« Nel determinare l'azione che l'ittiotossico esercita sul sistema nervoso, ho trovato le stesse difficoltà, e le medesime incertezze che si incontrano nello studio del veleno dei serpenti.

« Credo utile accennare lo stato della questione, perchè così apparirà meglio evidente un altro punto di contatto fra il veleno del sangue dei muredi, e quello delle ghiandole velenose dei serpenti.

« Le ricerche più complete che abbiamo fino ad ora su questo argomento oltre quelle celebri del Fontana furono fatte da Lauder Brunton e I. Fayrer. Essi hanno stabilito che la morte col veleno coagulato dei serpenti è prodotta invariabilmente dalla paralisi della midolla spinale e che i nervi motori sono poco lesi nella loro funzione, mentre che invece col veleno secco qualche volta predomina l'azione paralizzante sul midollo spinale e qualche altra predomina l'azione sui nervi (2).

« Wall nel suo libro sui serpenti velenosi dell'India (3) dice che il

(1) G. Valentin, *Einige Beobachtungen über die Wirkungen des Viperngiftes.* Zeitschrift für Biologie, 1877, p. 112.

(2) Proceedings of the Royal Society, vol. XXII, p. 93, 1874.

(3) Op. cit., pag. 81.

veleno della *Naja tripudians* produce gradatamente una paralisi generale, e che le convulsioni che precedono la morte sono prodotte unicamente dall'asfissia, mentre invece il veleno del *Daboja Russellii* produce forti convulsioni che non dipendono dall'acido carbonico, e la paralisi generale che vi succede viene seguita dall'arresto dei movimenti respiratori che prima diventano irregolari.

« Facendo delle ricerche sull'azione del veleno delle vipere nella medesima specie osservai queste due forme diverse di avvelenamento.

« Erano vipere che mi aveva spedito da Siena il sig. Brogi, prendevo il veleno, e lo amministravo nello stesso modo e nella stessa dose e ciò nulla meno osservavo delle differenze grandissime, tanto nei conigli, quanto nei cani. Alle volte col veleno della vipera morivano con delle convulsioni fortissime, in altri animali senza che io abbia potuto conoscere la causa, non si avevano convulsioni, o tutto al più compariva qualche leggero movimento epilettiforme delle estremità.

« Avendo osservato la medesima incostanza per l'azione del veleno dei murenidi, temo che vi siano delle variazioni individuali. Questa è una supposizione che forse dipende da che non sono ancora abbastanza numerose le mie esperienze; ma anche quando fosse dimostrato che esistono queste differenze individuali per la velenosità del siero nei vari individui, e per la maggiore o minore vulnerabilità delle vittime nelle quali si prova tale veleno, resterebbe pur sempre aperta una grande lacuna, che non vedo si possa presto colmare.

« Nei conigli che furono avvelenati col siero dei murenidi la rigidità cadaverica compare immediatamente dopo la morte. Gli esempi li ho dati nella Nota XIII, esperienza V e VIII. Questo è un fatto che ho verificato pure nelle rane e non l'ho mai osservato nei cani. Ho cercato facendo l'allacciatura dell'aorta addominale se era un fenomeno dovuto all'azione del veleno sopra i muscoli, o se tale fatto dipendeva da un' azione nervosa.

« Tali ricerche avendomi dato dei risultati incerti, mi limito per ora ad accennare il fatto, notando che anche col veleno delle vipere osservai nei conigli la comparsa rapidissima della rigidità cadaverica ed in meno di cinque minuti dall'arresto del cuore ».